

HUMBERTO JÁCOME SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DE PERICITOS E FOTOBIMODULAÇÃO NO
REPARO TECIDUAL EM MODELO MURINO DIABÉTICO**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Humberto Jácome Santos

INVESTIGAÇÃO DE PERICITOS E FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL EM MODELO MURINO DIABÉTICO

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof^ª. Ivana M. Alves Diniz e
Coorientador: Prof. Ricardo Alves de Mesquita.

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

S237i Santos, Humberto Jácome.
2021 Investigação de pericitos e fotobiomodulação no reparo
T tecidual em modelo murino diabético / Humberto Jácome
Santos. -- 2021.

65 f. : il.

Orientadora: Ivana Márcia Alves Diniz.
Coorientador: Ricardo Alves de Mesquita.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Pericitos. 2. Cicatrização. 3. Diabetes mellitus. 4. Lasers. I. Diniz, Ivana Márcia Alves. II. Mesquita, Ricardo Alves de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB 6/2727.



FOLHA DE APROVAÇÃO

INVESTIGAÇÃO DE PERICITOS E FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL EM
MODELO MURINO DIABÉTICO

HUMBERTO JÁCOME SANTOS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Patologia Bucal.

Aprovada em 26 de novembro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Ivana Marcia Alves Diniz – Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Ricardo Alves Mesquita – Co-orientador
FO-UFMG

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
UFMG

Prof(a). Giovanna Ribeiro Souto
PUC-MINAS

Prof(a). Sérgio de Melo Alves Júnior
UFPA

Prof(a). Tatiana Fernandes Araujo Almeida
UFMG

Belo Horizonte, 26 de novembro de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 15 / 11 /2021.

Prof. Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu
Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho à Profa. Ana Cláudia Braga Amoras Alves, como um singelo agradecimento por ter me introduzido e guiado no caminho da ciência, desde a graduação em Odontologia. Obrigado pelo apoio incondicional ao longo de toda esta jornada acadêmica e para além dela. Gratidão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela energia vital;

Aos professores orientadores: Ivana Márcia Alves Diniz e Ricardo Alves de Mesquita;

As instituições e laboratórios que colaboraram com este trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq; Faculdade de Odontologia (FAO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgias Odontológicas – CPC/ UFMG; Programa de Pós-Graduação em Odontologia -UFMG, na pessoa da coordenadora, Prof^a Isabela Almeida Pordeus; Instituto de Ciências Biológicas – ICB/ UFMG; Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/ MG, em nome da técnica Camila, pela imensa ajuda de sempre, fazendo tudo com excelência; Laboratório de Patologia Experimental (FAO-UFMG), em nome da Prof^a Tarcília Silva, pela imensa prestatividade em colaborar e ceder espaço no seu laboratório para os experimentos; Laboratório de Patologia (FAO-UFMG), em nome de Domênico, Mara Quintela e Dani, pelo excelente serviço técnico prestado; Laboratório de Imunofarmacologia (ICB/UFMG), em nome do Prof. Flávio, por gentilmente nos permitir o uso deste espaço; Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina Veterinária/ UFMG, em nome da Prof^a Fabíola Lemos e o técnico Nathan, que foram extremamente prestativos na colaboração; a Prof^a Lucíola (ICB/UFMG), por colaborar juntamente com seus alunos Marina Barcelos e Elder Kodney; a Prof^a Gleide Avelar (ICB/UFMG), por nos ceder espaço no biotério para desenvolvermos nossas pesquisas; O Prof. Alexander Birbrair, juntamente com os alunos Pedro Prazeres e Carol Picoli.

Ao corpo docente da FAO-UFMG, em nome dos professores: Ricardo Gomez, Tarcília Silva, Maria Cássia, Felipe Paiva, Soraia Macari, Ricardo Mesquita, Lucas Guimarães e Mauro Henrique.

Aos professores da FAO-UFPA, por sempre me apoiaram na caminhada acadêmica: Sérgio Alves, Ana Cláudia Amoras, Sueli Kataoka, João Pinheiro.

Aos meus familiares, e especialmente ao meu companheiro Ricardo Felipe dos Santos Silva, pela parceria em todos os momentos.

E aos amigos: Mariana Saturnino, Camila Oliveira Kato, Sara Oliveira, Gabriela Ribeiro, Vinícius Matos, Mylena Cruzinha, Natália Gomes e Luiza Almeida, pelo apoio incondicional.

RESUMO

Em indivíduos com diabetes mellitus (DM) o reparo tecidual cutâneo atrasado representa um desafio para o sistema de saúde. Evidências recentes mostram o potencial da fotobiomodulação (PBM, do inglês, *photobiomodulation*) em induzir a diferenciação de células-tronco em múltiplos tecidos. Os pericitos são células-tronco perivasculares com ampla plasticidade, podendo ser considerados alvos potenciais para a PBM durante o reparo tecidual. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da PBM na modulação de células indiferenciadas em feridas de camundongos em condição sistêmica análoga ao DM tipo-II. Trata-se de um estudo *in vivo* (CEUA#62/2019) utilizando camundongos transgênicos diabéticos induzidos artificialmente e com marcação endógena para pericitos (NG2+/DsRed+; Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+) e células mesenquimais indiferenciadas (Nestina+/GFP+). Foram realizadas bilateralmente feridas no dorso dos camundongos, e as mesmas foram submetidas ou não a PBM e avaliadas nos tempos experimentais 1, 3 e 7 dias. O reparo tecidual foi acompanhado por morfometria, avaliação de fluxo sanguíneo, análises histológicas nos tempos 1, 3 e 7 dias, além de identificação dos pericitos por microscopia confocal ao final de 3 e 7 dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. As análises morfométricas e histológicas mostraram maior efeito de reparo nas feridas submetidas a PBM, onde a média de área remanescente após 1 de PBM foi 73% da medida de área total inicial no grupo PBM e 86,21% no controle ($p=0,0257$); aos 3 dias, foram 66,98% e 87,49% respectivamente ($p=0,026$) e aos 7 dias, 25,54% no grupo PBM e 39,43% no controle ($p<0,05$). A perfusão sanguínea foi maior nas áreas das feridas quando comparadas a pele íntegra, no entanto, não foram observadas diferenças entre as feridas submetidas ou não a PBM. Por outro lado, foram observadas nestas (PBM), maiores quantidades de células mesenquimais indiferenciadas (Nestina+/GFP+) e de pericitos tipo-I (NG2+/DsRed+) após 7 dias. A utilização de PBM em processos de reparo tecidual em modelo diabético de feridas demonstraram resultados significativos tanto clínicos com a nível celular, envolvendo em grande parte as células mesenquimais (nestina+/GFP+) e pericitos (NG2+/DsRed+). Conhecer os mecanismos celulares de ação da PBM em feridas de modelo diabético permite controlar esse processo, além de explorar essa técnica e abrir caminhos para investigação de outras ferramentas e protocolos úteis para o tratamento de feridas nestes indivíduos afetados.

Palavras-chaves: Pericitos. Regeneração tecidual em feridas. Reparo tecidual. Diabetes mellitus. Fotobiomodulação. Laser.

ABSTRACT

Investigation of pericytes under effect of photobiomodulation in tissue repair of diabetic murine mice

In individuals with diabetes mellitus (DM) delayed cutaneous tissue repair represents a challenge for the health system. Recent evidence shows the potential of photobiomodulation (PBM) to induce stem cell differentiation in multiple tissues. Pericytes, in turn, are perivascular stem cells with wide plasticity and can be considered potential targets for PBM during tissue repair. The objective of this study was to investigate the role of PBM in stem cell modulation in wounds of mice under systemic condition analogous to type-II DM. This is an *in vivo* study (Ethical protocol: CEUA#62/2019) using artificially induced transgenic diabetic mice with endogenous labeling for pericytes (NG2+/DsRed+; Nestin+/GFP+ & NG2+/DsRed+) and undifferentiated mesenchymal cells (Nestin+/GFP+). Wounds on the mice's back were bilaterally performed, and then submitted or not to laser therapy and evaluated at experimental times 1, 3 and 7 days. Tissue repair was followed by periodic measurements of wound diameter, blood flow assessment, histological analysis and screening of pericytes by confocal microscopy at the end of each experimental time. The data obtained were submitted to statistical analysis. The histologic and morphometric analysis showed a greater repair effect in wounds submitted to PBM, where the average area remaining after 1 day of laser application was 73% of the initial total area measurement in the PBM group, and 86.21% in the control ($p= 0.0257$); at 3 days, they were 66.98% and 87.49% respectively ($p= 0.026$), and at 7 days, 25.54% in the PBM group and 39.43% in the control ($p<0.05$). Blood perfusion was greater in wound areas when compared to intact skin, however, no statistical differences were observed between wounds submitted or not to PBM. On the other hand, larger amounts of undifferentiated mesenchymal cells (Nestin+/GFP+) and type-I pericytes (NG2+/DsRed+) were observed in these wounds after 7 days. The use of PBM in tissue repair processes in a diabetic wound healing model showed significant clinical and cellular results, involving mostly mesenchymal cells (nestin+/GFP+) and pericytes (NG2+/DsRed+). Knowing the cellular mechanisms of action of PBM in wounds of diabetic, allows better management of the therapy, also it opens paths for the investigation of other tools and protocols useful for the treatment of wounds in DM individuals.

Keywords: Pericytes. Tissue regeneration in wounds. Tissue repair. Diabetes mellitus. Photobiomodulation. Laser.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mecanismo celular de controle da glicose na circulação sanguínea...	19
Figura 2- Modelo de feridas	30
Figura 3- Laser diodo	31
Figura 4- Ilustração das medições de diâmetro	32
Figura 5- Ilustração do laser Doppler	33
Figura 6- Ilustração da coleta do soro.....	34
Figura 7- Peso, glicemia e dosagem de frutossamina dos animais	36
Figura 8- Análises morfométricas	37
Figura 9- Análise morfométrica em gráfico de linhas	38
Figura 10- Ilustrações gráficas das análises de perfusão sanguínea	39
Figura 11- Quantificação de pericitos no tempo experimental 3 dias.....	40
Figura 12- Quantificação de pericitos no tempo experimental 7 dias.....	42
Figura 13- Associação do padrão de fluorescência com o aspecto histológico.....	44
Quadro 1- Distribuição dos grupos amostrais	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Do inglês, <i>Advanced Glycation End-products</i>
AKT	Sinônimo de proteína quinase B
Ang- II	Angiotensina II
ATP	Adenosina Trifosfato
Bcl2	Do inglês: <i>B-cell lymphoma 2; Apoptosis Regulator</i>
BMPs	Do inglês, <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
CDC	Do inglês: <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cit-c	Citocromo C Oxidase
cm ²	Centímetros Quadrados
CO ₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclooxigenase
DH	Diâmetro Horizontal
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DsRed	Do inglês: <i>Red Fluorescent Protein</i>
DV	Diâmetro Vertical
EGFR	Do inglês: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERKs	Do inglês: <i>Extracellular Signal-regulated Kinases</i>
ET-1	Endotelina 1
FBL	Fotobiomodulação a Laser
GF	Do inglês: <i>Growth Factor</i>
GFP	Do inglês: <i>Green Fluorescent Protein</i>
GLUT4	Do inglês: Glucose Transporter 4
GLUT1	Do inglês: Glucose Transporter 1
GSH	Glutathione
GSSG	Dissulfeto de Glutathione
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O	Molécula da água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HSCs	Do inglês: <i>Hematopoietic Stem Cells</i>

IDF	Do inglês: <i>Internacional Diabetes Federation</i>
IP	Intraperitoneal
J/Kg	Joule/ Quilograma
mg/dL	Miligrama/ Densilitro
Mm	Milímetro
MSCs	Do inglês: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
mW	Miliwatt
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NF-κB	Do inglês: <i>Nuclear Factor κ B</i>
NG2	Neural Glial Antigen 2
nm	Nanômetro
NO	Do inglês: <i>Nitric Oxide</i>
NOS-i	Do inglês: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
OCT	Do inglês: Optimal Cutting Temperature
PBM	Do inglês: <i>Photobiomodulation</i>
PC	Pró-hormônios convertases
PGL2	Prostaglandina 2
PI3K	Do inglês: <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
r	Raio
RKTs	Do inglês: <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
RNA	Do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	Do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>
s	Segundos
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TGF-β1	Do inglês: <i>Transforming Growth Factor β1</i>
TIMP	Do inglês: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
UP4A	Dinucleotídeo Uridina Adenosina Tetrafosfato
W/cm ²	Unidade de intensidade: Potência por Área Superficial
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
U\$	Dólar
β	Beta
$A = \pi \times r^2$	Fórmula de área
π	Valor da constante (3,14)
+	Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Diabetes mellitus	18
2.1.1	Fisiopatologia do Diabetes mellitus	18
2.2	Reparo tecidual	20
2.3	Pericitos	23
2.4	Fotobiomodulação	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Aspectos éticos	29
4.2	Animais transgênicos.....	29
4.3	Grupos experimentais	29
4.4	Indução artificial ao DM	30
4.5	Ferida bilateral e PBM	31
4.6	Análises morfométricas das feridas	33
4.7	Perfusão sanguínea (Doppler)	34
4.8	Eutanásia e coleta das amostras	35
4.8.1	Amostras de soro (Frutosamina)	35
4.9	Hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson	36
4.10	Microscopia confocal	36
4.11	Análises estatísticas.....	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Caracterização da indução ao DM	38
5.2	Análises morfométricas	38

5.3	Análise de perfusão sanguínea	41
5.4	Quantificação de pericitos.....	42
5.5	Análises histológicas	46
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A – parecer de aprovação do CEUA	67

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM), ou diabetes, representa um desafio à saúde pública. Desde 1980, o número de pessoas afetadas aumentou consideravelmente, passando de 108 milhões para 422 milhões, e cerca de 1,6 milhões de mortes foram causadas diretamente por essa doença (WHO, 2019a). Dificuldade no reparo tecidual em feridas ou loja cirúrgica é um problema comum em pacientes diabéticos, especificamente no DM tipo II, devido a alterações metabólicas sistêmicas crônicas com efeito direto na fisiologia tecidual de reparo, consequentes principalmente de um processo crônico de hiperglicemia (WHO, 2019a).

O DM mal controlado também agrava o risco de complicações debilitantes, como cegueira, insuficiência renal, doenças cardíacas, derrames e amputações (FU *et al.*, 2019; WHO, 2019b). Além disso, os altos custos dos tratamentos relacionadas à deficiência no reparo tecidual aumentam a importância dos estudos em busca de terapias capazes de interagir com o tecido lesionado, tendo por objetivo corrigir o processo de reparo tecidual deficiente. Dados do CDC (do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*) informam que 15,5% da população mundial com idade superior a 30 anos é composta de diabéticos, dos quais cerca de 15% desenvolvem úlceras de difícil cicatrização ao longo da vida. Assim, 6% das internações hospitalares relacionadas aos diabéticos são consequência direta dessas úlceras. Esses casos geram para os sistemas de saúde custo extra que varia de U\$ 8.000 a U\$ 12.000/paciente. Além disso, segundo a IDF (do inglês, *Internacional Diabetes Federation*), estima-se que 10% das despesas globais de saúde são gastos com a doença, e que em 2045, o número de pessoas com diabetes aumentará em 62% na América do Sul e Central. No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), no último levantamento realizado em 2017, estimou a existência de 12,5 milhões de pessoas diagnosticadas com DM, sendo o quarto país com o maior número de indivíduos com a doença. No entanto, é o sexto país do mundo em gastos com diabetes, e quando se considera o gasto por pessoa, o Brasil não se estabelece entre os 10 países que tem maior investimento médio por indivíduo com diabetes. Os gastos em saúde decorrentes do DM totalizam 29.3 bilhões de reais e estima-se que tendem a aumentar em 30% até 2045. Diante disso, estudos

têm sido realizados para melhorar a qualidade de vida desta parcela da população portadora do DM, principalmente voltados a compreender as alterações metabólicas que desregulam o reparo tecidual, na perspectiva de controlar e otimizar este processo (LIU *et al.*, 2020; LWIN *et al.*, 2020; YUDOVSKY *et al.*, 2011). Além disso, para conhecer melhor o efeito das terapias já existentes, como a fotobiomodulação (PBM, do inglês, *photobiomodulation*), na perspectiva de melhorias no tratamento e minimização dos gastos com esta doença.

Na Odontologia, pacientes não-diagnosticados ou com diabetes descompensado, quando submetidos a procedimentos cirúrgicos podem apresentar atraso no reparo tecidual e maior risco de infecções secundárias (NADER *et al.*, 2006). Desta forma, entender o mecanismo de reparo tecidual e meios de acelerar este processo em indivíduos com DM se apresenta como uma estratégia para melhoria da qualidade de vida e otimização do orçamento público em saúde. Nesse sentido, a PBM que já é uma tecnologia auxiliar na recuperação dos pacientes, precisa ser melhor consolidada.

Apesar das inúmeras constatações sobre os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação a laser (FBL) ou PBM, reportadas na literatura, a mesma ainda aparece como ciência altamente especulativa, especialmente devido à grande quantidade de evidências incompletas ou contraditórias em relação ao assunto (OYEBODE, HOURELD, ABRAHAMSE, 2021).

É possível que a PBM, por seus princípios, consiga compensar considerável parte das limitações fisiológicas decorrentes do diabetes, no que diz respeito ao processo de reparo tecidual. Neste sentido, nossa hipótese é que os pericitos participam no reparo tecidual e podem ser alvos diretos da PBM em feridas de indivíduos diabéticos. Assim, compreender melhor o processo de reparo tecidual, assim como o papel da PBM no estímulo e recrutamento dos pericitos em modelo animal diabético se faz necessário, na construção de evidências científicas mais sólidas a respeito desta terapia, desta forma contribuindo para sua melhor utilização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus (DM)

Os primeiros registros que se tem do DM foram documentado pelos egípcios, como uma doença caracterizada por perda de peso e poliúria. No entanto, foi o médico grego Aertaeus que a denominou pelo termo diabetes mellitus. Que etimologicamente em grego, diabetes significa "passar", e mellitus, palavra oriunda do latim que significa "mel", referindo-se portanto a condição do indivíduo afetado, que é caracterizada principalmente por um estado de "excesso de açúcar no corpo" (SAPRA, BHANDARI, 2021).

Com o avanço da industrialização no mundo, acompanhado pelo aumento no número dos casos de obesidade, o diabetes se manifestou como uma epidemia global e pesquisas recentes prevêem um aumento na prevalência do diabetes em adultos de 4% em 1995 para 6,4% até o ano de 2025. Estima-se também que os países mais afetados por esta epidemia em 2025 serão Índia, China e Estados Unidos (KHAN *et al.*, 2020). Outro dado, é que ainda hoje estima-se a existência de uma grande população, em torno de 50%, de pacientes sem diagnóstico ou em condição pré-diabética (KHAN *et al.*, 2020).

A mudança na taxa de expectativa de vida e a falta de melhorias nos cuidados com a saúde, são em parte responsáveis pelo aumento surpreendente na incidência do DM, principalmente nas áreas urbanas. Conseqüentemente, os países em todo o mundo enfrentarão um aumento significativo na demanda de cuidados de saúde, uma vez que os pacientes com diabetes estão sujeitos a complicações de curto e longo prazo (KHAN *et al.*, 2020). Neste sentido, o diabetes é um problema de saúde relevante, responsável por milhares de mortes anualmente.

2.1.1 Fisiopatologia do diabetes mellitus

No corpo humano, há vários sistemas e vias que funcionam em sincronia para produzir e manter um estado fisiológico saudável, uma condição de equilíbrio denominada homeostase. Qualquer evento desregulador da homeostase pode levar ao desenvolvimento de uma lesão ou estado patológico

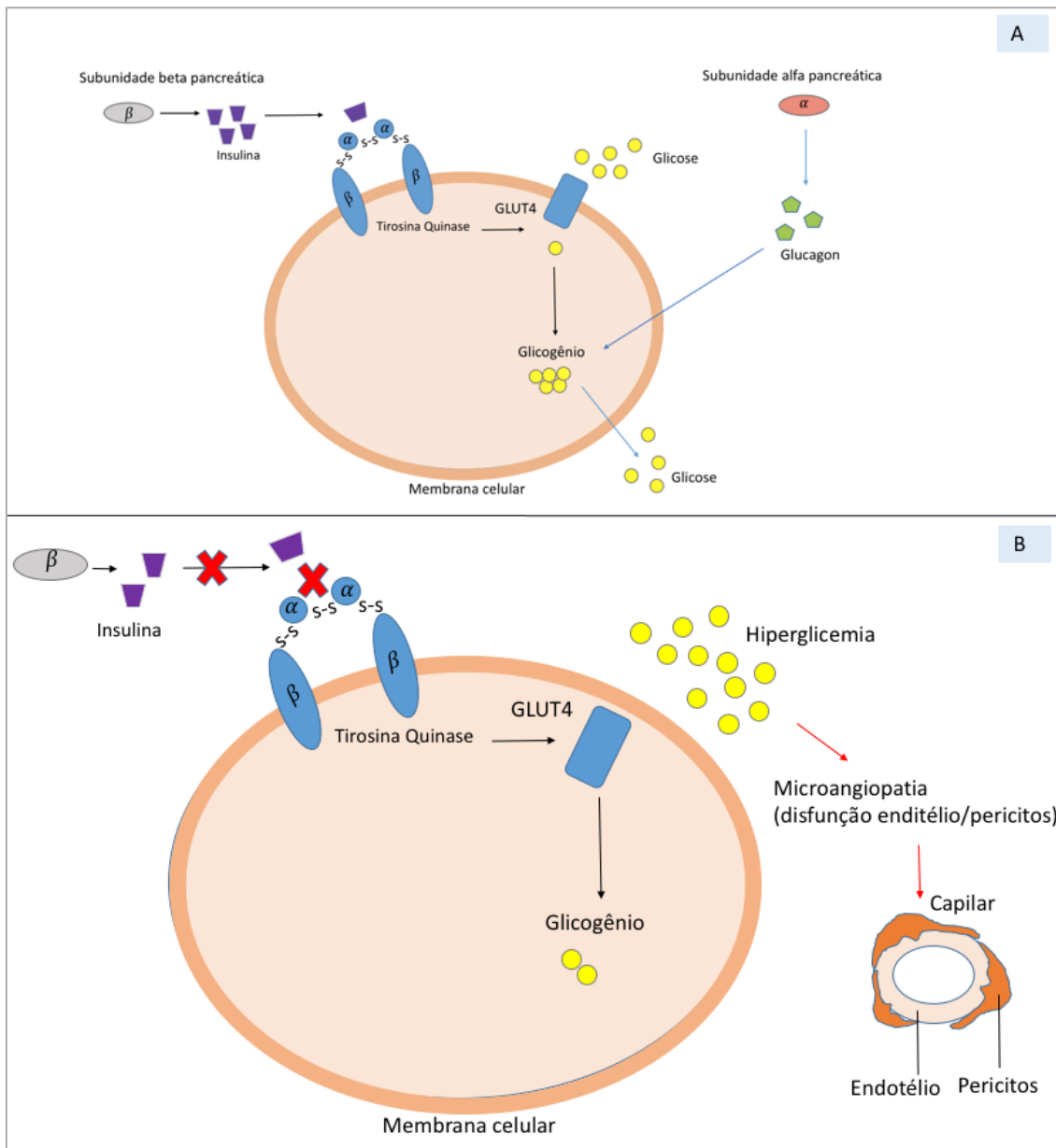
no organismo. O DM reduz a capacidade de um indivíduo de regular o nível de glicose na corrente sanguínea, resultando em uma série de complicações secundárias (SAPRA, BHANDARI, 2021).

A regulação dos níveis de glicose no sangue é baseada em um ciclo de feedback negativo e atua por meio da liberação de insulina e glucagon. Quando os níveis de glicose no sangue estão altos, as células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas são acionadas para liberar insulina, um polipeptídeo de 51 aminoácidos que é composto por duas cadeias (A e B) conectadas via pontes dissulfeto. A insulina é sintetizada a partir da pró-insulina pelas pró-hormônios convertases (PC I e PC2) e pela exo-protease carboxipeptidase. Como produto da ação dessas enzimas, tem-se insulina e o peptídeo C (GUTHRIE, GUTHRIE, 2004).

A insulina se liga ao receptor de insulina tirosina quinase, que é composto de duas subunidades α (extracelular) e duas subunidades β (intramembrana) ligadas por ligações dissulfeto. A ligação da insulina à tirosina quinase promove a autofosforilação. A insulina sinaliza ao fígado para converter o excesso de glicose em glicogênio para armazenamento; também ativa outras células do corpo (células do músculo adiposo/esquelético) para absorver mais glicose pela translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície celular. Isso ajuda a equilibrar as concentrações de glicose circulante para níveis normais (KHORAMI *et al.*, 2015). Quando a concentração de glicose no sangue é baixa, as células α do pâncreas são estimuladas a liberar glucagon. O glucagon sinaliza ao fígado para converter o glicogênio armazenado em glicose, que é liberada no sangue para atingir a homeostase (KHORAMI *et al.*, 2015) (Fig. 1A)

No diabetes, há uma alteração na síntese ou secreção de insulina, conforme observado no DM tipo I e estenose no ducto pancreático, ou o desenvolvimento de resistência à insulina ou sua produção subnormal como no caso do DM tipo II e alguns diabetes secundários (Fig. 1B) (KHORAMI *et al.*, 2015).

Figura 1- Mecanismo celular de controle da glicose na circulação sanguínea.



Legenda: A) Mecanismo celular de controle da glicose na circulação sanguínea; B) Alterações metabólicas na via da insulina resultam em hiperglicemia e podem resultar em disfunção endotelial, afetando a comunicação endotélio/ pericitos.

Fonte: próprio autor.

2.2 Reparo tecidual

As feridas se desenvolvem como consequência de danos teciduais, geralmente causadas por injúria, corte ou qualquer outro artifício mecânico que possa danificar a integridade tecidual. Após a lesão, inicia-se um processo

coordenado para o reparo, normalmente regulado por fatores de crescimento e sinalização estimulada por citocinas (BIELEFELD, AMINI-NIK, ALMAN, 2013). No decorrer da cicatrização de feridas, fatores de crescimento/ citocinas orquestram a sinalização inter e intracelular para proliferação, diferenciação, migração celular e síntese de proteínas. Em circunstâncias normais, este processo resulta em um reparo previsível da forma e função estrutural do tecido, onde as células incluindo fibroblastos, plaquetas, células imunológicas, queratinócitos e células endoteliais microvasculares juntamente com células tronco perivasculares (pericitos) – que possuem papel essencial na angiogênese - desempenham um papel significativo (DEMIDOVA-RICE, HAMBLI, HERMAN, 2012). Imediatamente após a ocorrência da lesão, uma rápida reação imunológica, acúmulo de matriz extracelular (ECM) e coordenação de todos os mecanismos celulares da epiderme são acionados para restaurar a homeostase do tecido local. O reparo de feridas é dividido em quatro fases principais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Para que este processo seja concluído, é necessária coordenação eficaz entre eventos moleculares, celulares, físicos entre as células hematopoéticas, imunológicas e locais da pele (SUN, SIPRASHVILI, KHAVARI, 2014). No entanto, este processo pode ser comprometido ou desequilibrado quando na presença de doenças sistêmicas coexistentes, incluindo DM (CASTILHO, SQUARIZE, GUTKIND, 2013). Feridas que falharam no progresso através das fases normais de reparo, podem assumir um caráter crônico e muitas vezes parecem estagnar na fase inflamatória (FRYKBERG, BANKS, 2015).

O surgimento de uma ferida em um organismo desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas com objetivo de reparar o tecido lesionado, mas em pacientes diabéticos não-diagnosticados ou não-controlados, este reparo é lentificado (BREM et al., 2007). Vários mecanismos são apontados como fatores importantes na diminuição do processo de reparo tecidual em diabéticos, dentre eles, a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species* - ROS), diminuição do Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide* - NO), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (do inglês, *Growth Factors* - GFs) e das proteínas da via de sinalização da insulina (BREM et al., 2007; KOLLURU et al., 2012). A presença da disfunção endotelial, caracterizada pela incapacidade dos vasos em desempenhar suas funções na

regulação do tônus vascular em resposta a um estímulo, leva a um microambiente tecidual isquêmico, representando um evento de grande impacto na resposta tecidual a injúria. Esta disfunção está associada com a diminuição da biodisponibilidade do NO, pela diminuição da produção de NO pelo endotélio e/ou aumentada inativação do NO por ativação de ROS (KANETO *et al.*, 2010). A excessiva produção de ROS em pacientes diabéticos é um fator primário que contribui para deficiências de cicatrização de feridas. Já foi demonstrado que a cicatrização de feridas e a angiogênese são prejudicadas pela redução de NO dependente de NOS-induzível (do inglês, *inducible Nitric Oxide Synthase* - iNOS), que também interfere na expressão de GFs (KANETO *et al.*, 2010). Além disso, é também descrita a diminuição da expressão do Fator de Crescimento Transformador β 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor β 1*; TGF β 1), um potente modulador da atividade da colagenase e da secreção de Inibidores Teciduais da Metaloproteinases (do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* - TIMPs).

O estudo de células-tronco no processo de reparo tecidual pós-injúria tem sido investigado (GAN *et al.*, 2010; LEI *et al.*, 2018). Na última década, numerosos estudos estabeleceram o potencial de pericitos na diferenciação em vários tipos celulares e o consenso sustenta que são células com alta plasticidade (BIRBRAIR *et al.*, 2017, 2013). Devido à sua localização perivascular e compartilhamento de marcadores de indiferenciação similares às células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*), os pericitos têm sido reconhecidos como verdadeiras células-tronco pela sua ampla plasticidade e distribuição no organismo. O recrutamento de células-tronco para áreas de reparo tecidual, o qual normalmente acontece de forma fisiológica durante a neoformação vascular, é uma etapa fundamental neste processo (GUTHRIE, GUTHRIE, 2004). Já se tem observado que os pericitos são células de grande importância neste evento, no entanto, em indivíduos diabéticos, tem se relatado a condição de hiperglicemia como causa direta de disfunção endotelial e perda de pericitos, afetando diretamente o reparo tecidual (BANARJEE *et al.*, 2018; WIMMER *et al.*, 2019). Nesse sentido, na literatura tem-se procurado alternativas de compensação ou melhorias neste processo.

A fotobiomodulação (PBM, do inglês, *photobiomodulation*), tem sido utilizada em saúde para diferentes finalidades, dentre elas, para acelerar o

processo de reparo tecidual cutâneo ou em mucosas. Apesar de amplamente utilizada e ter demonstrado efeitos significativos, ainda é necessário se conhecer melhor os mecanismos moleculares e efeitos celulares resultantes da ação desta ferramenta. Evidências recentes de que a PBM seja capaz de controlar processos inflamatórios e imunológicos, recrutar e induzir a diferenciação de células-tronco em múltiplos tecidos tem contribuído para que essa terapia seja reconhecida como importante coadjuvante no reparo tecidual (do VALLE *et al.*, 2020). Há, inclusive, estudos que apontam que os pericitos podem ser alvos da fotobiomodulação (MEDRADO *et al.*, 2008, 2010; do VALLE *et al.*, 2020).

No estudo de do Valle *et al.* (2020) utilizando o mesmo modelo experimental de ferida e linhagem de camundongos (Nestina+GFP+ & NG2+/DsRed⁺) saudáveis (não-diabéticos), verificou que pericitos e células mesenquimais indiferenciadas acumularam-se na região epidérmica da ferida sob estímulo da PBM (do VALLE *et al.*, 2020). No entanto, ainda não está claro, se há uma ativação direta desses pericitos/ células indiferenciadas, pela PBM, ou se o acúmulo dessas células é devido à extensiva rede vascular na região injuriada, resultante de um estímulo à angiogênese induzida pela terapia. Além disso, não se conhece o comportamento dessas células em organismos sistemicamente afetados pelo DM.

Apesar do conhecimento prévio que se tem sobre os efeitos clínicos da PBM no reparo tecidual em modelos saudáveis (não-diabéticos), e saber que a terapia da PBM já tem mostrado resultados promissores também em indivíduos sistemicamente acometidos pelo DM, ainda se conhece pouco sobre os eventos celulares desta terapia sob feridas neste grupo de indivíduos, que por sua vez possui uma série de alterações metabólicas, tornando este evento ainda mais complexo. Além disso, a falta de um bom modelo experimental (diabético tipo II) para compreensão detalhada dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo dificulta o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e direcionados.

2.3 Pericitos

Na última década, estudos têm reconhecido o potencial de pericitos os como células com alta plasticidade (BIRBRAIR *et al.*, 2017). Os pericitos são

células perivasculares, que compartilham a membrana basal junto com células endoteliais (ARMULIK *et al.*, 2011; BIRBRAIR *et al.*, 2015). Entretanto, a origem exata dos pericitos é uma questão central na biologia do desenvolvimento. Os estudos de rastreamento de linhagem indicam que os pericitos na região cefálica são de origem neuroectodérmica (SIMON *et al.*, 2012). Na maioria dos outros órgãos, os pericitos derivam do mesoderma (ASAHINA *et al.*, 2011). De fato, essas células mostram-se heterogêneas em relação à sua origem, mesmo dentro do mesmo tecido (ARMULIK *et al.*, 2011; PRAZERES *et al.*, 2017).

Além de estabilizar fisicamente os vasos sanguíneos, os pericitos contribuem para sua arquitetura normal; para o desenvolvimento vascular, na maturação e remodelação; e também regulam a permeabilidade e o fluxo sanguíneo (PALLONE *et al.*, 2003). Podem ainda afetar a coagulação do sangue (BOUCHARD *et al.*, 1997; FISHER, 2009) e desempenhar papel na função imunológica ao regularem a ativação de linfócitos (FABRY *et al.*, 1993; VERBEEK *et al.*, 1995). Nesse sentido, desempenham funções de grande importância no reparo tecidual.

São células com capacidade de diferenciação miogênica, adipogênica, angiogênica e neurogênica (BIRBRAIR *et al.*, 2015). De fato, as tão estudadas MSCs, seriam, na verdade, células que compõe o estroma adjacente a vasos sanguíneos que um dia foram identificadas como pericitos. Da mesma forma, Células-tronco Progenitoras Hematopoiéticas (do inglês, *Hematopoietic Stem Cells*- HSCs) seriam, na verdade, derivadas de pericitos (BIRBRAIR *et al.*, 2015; BIRBRAIR *et al.*, 2017; BORGES *et al.*, 2017). É possível conforme apontam os estudos, que os pericitos sejam importantes alvos da PBM devido sua incrível versatilidade (MEDRADO *et al.*, 2008, 2010; do VALLE *et al.*, 2020).

2.4 Fotobiomodulação (PBM)

Uma reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por uma molécula fotorreceptora (fotoceptora) nativa (KARU *et al.*, 1999). Esse é o caso do citocromo c oxidase (cit-c) – uma porfirina endógena – e de algumas flavinas (ex: nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase ligada com hidrogênio - NADH) presentes em organelas citoplasmáticas de células eucariontes (GAO, XING, 2009). Quando excitada, a

cit-c provê maior taxa de bombeamento de prótons de hidrogênio para o espaço interno mitocondrial (PASTORE *et al.*, 1992). Parte dessa energia liberada é usada para gerar um gradiente de prótons que é então utilizado para a síntese de ATP (Adenosina- 5'-trifosfato). Por fim, o aumento na produção de ROS em decorrência do maior número de ciclos respiratórios atua em sinergia com níveis aumentados de ATP para o desencadeamento de eventos celulares importantes. Contudo, o balanço dos níveis de radicais livres dentro das células é crítico e compõe um intrincado sistema regulatório (PASTORE *et al.*, 1992). Dessa forma, níveis muito aumentados de ROS, não compensados pelas enzimas antioxidantes teciduais, podem gerar efeitos inibitórios pelo PBM.

Os efeitos da PBM por radiação vermelha ou infravermelha também podem estar diretamente relacionados a alterações conformacionais em fatores de crescimento como TGF β 1. Em decorrência da produção controlada de ROS, há evidência de que morfogenes importantes possam eventualmente ser ligados ou desligados por meio da PBM. Em 2007, Arany *et al.* reportaram a habilidade da PBM em ativar TGF β em processos cicatriciais de feridas. TGF β s são uma superfamília de fatores de crescimento, na qual incluem-se as BMPs (do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*), conhecidas por modularem a pluripotência e diferenciação de células-tronco (MULLEN *et al.*, 2011; XI *et al.*, 2011).

Em 2014, uma publicação no periódico *Science Translational Medicine* colocou em destaque os efeitos da fotobiomodulação na regeneração dos tecidos dentário (ARANY *et al.*, 2012, 2014). Os resultados deste estudo indicamram que, por meio da produção de radicais livres de oxigênio, a PBM pode ativar TGF β 1 endógeno que, por sua vez, é capaz de mediar a diferenciação de células-tronco do hospedeiro para promover regeneração tecidual dentária. Além disso, o TGF β é um importante citocina anti-inflamatória capaz de modular a influência de células imunológicas na regeneração tecidual. O estudo de Arany e colaboradores de 2014 é o mais importante no campo da PBM por demonstrar que a PBM pode ser estímulo singular à regeneração de dentina terciária por meio de *cell homing*, ou seja, utilizando apenas células-tronco residuais do hospedeiro. Nossa linha de pesquisa vem sendo desenvolvida nesse sentido já há alguns anos e, recentemente, também observamos *in vitro* e *in vivo* a capacidade regenerativa da PBM utilizando

apenas *homing* ou células-tronco transplantadas (MOREIRA *et al.*, 2017; DINIZ *et al.*, 2018).

O aumento nos níveis de H₂O₂ decorrentes da PBM também pode ativar fatores de transcrição sensíveis à variação nos estados redox, com o NF-κB (do inglês, *Nuclear Factor κ B*) (D'ANGIO, FINKELSTEIN, 2000). Chen *et al.* (2012) demonstraram que baixos níveis de irradiação (0.903; 3 ou 30 J/cm²) na região de frequência de onda próxima ao vermelho, podem ativar NF-κB em fibroblastos embrionários de camundongos. A ativação é mediada por ROS e inibida na presença de ácido ascórbico (antioxidante). Tanto a PBM como inibidores mitocondriais – bloqueadores do fluxo normal de elétrons – produzem ROS e ativam NF-κB, mas a PBM aumenta os níveis de ATP, enquanto os inibidores reduzem a produção de energia. O NF-κB, por sua vez, é capaz de regular a expressão de múltiplos genes (WANG *et al.*, 2002) e ainda governar funções celulares relacionadas à inflamação e à produção de proteínas ligadas à proliferação, migração e aumento na síntese de colágeno, ou respostas induzidas por estresse (CAMPBELL, PERKINS, 2006). Curiosamente, a ativação de NF-κB verificada no estudo de Campbell & Perkins (2006) é de cunho pró-inflamatório, enquanto alguns estudos reportam que a PBM tem ação antiinflamatória (MAFRA de LIMA *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2013). Os autores discutem que a indução de óxido nítrico sintase ou produção de eicosanóides podem ser eventos secundários (mediatos) da estimulação pró-inflamatória da terapia levando à cessação da inflamação (HOURELD *et al.*, 2010). Recentemente, estudos têm apontado o caráter ambíguo da PBM, que pode se comportar tanto de forma pró-inflamatória como anti-inflamatória, dependendo da densidade de energia aplicada (HAMBLIN, 2017; LI *et al.*, 2020). De fato, as condições experimentais e o intervalo de observação dos efeitos da PBM parecem ser críticos na determinação dos efeitos imediatos e mediados da terapia.

Em síntese, após a PBM, são observados aumentos na proliferação e migração celular, síntese de DNA e RNA – por exemplo, com produção de proteínas constituintes da matriz celular (fibronectina e colágeno) – propriedades imunomodulatórias melhoradas, angiogênese, efeitos neurotróficos, entre outros (CHALAZONITIS *et al.*, 1992; DAMANTE *et al.*, 2009; EDUARDO *et al.*, 2008; GARAVELLO *et al.*, 2004; LETTERIO, 2000; MILORO e REPASKY, 2000;

MOREIRA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2002; POURREAU-SCHNEIDER *et al.*, 1990; SOUIL *et al.*, 2001; SOUSA *et al.*, 2009; TADAKUMA, 1993;). Esses efeitos podem ser particularmente importantes na cicatrização de feridas sob condição de DM, que devido ao excesso de glicose na circulação sanguínea, por produção inexistente ou ineficiente da insulina -hormônio responsável pela entrada de glicose nas células-, há formação de *advanced glycation end-products* (AGEs). Esses produtos afetam diretamente os fatores de crescimento, fibras e células relacionados à cicatrização e se ligam às células de defesa, dificultando a resposta imunológica do indivíduo frente às infecções (ROVAL *et al.*, 2016). Além disso, promovem disfunção endotelial e perda da comunicação entre células endoteliais e pericitos (BANARJEE *et al.*, 2018; WIMMER *et al.*, 2019), evento de grande impacto no sucesso do reparo tecidual em diabéticos.

Diante disso, hipotetiza-se que a PBM poderia agir sobre os pericitos e células mesenquimais indiferenciadas (Nestina+/GFP+) promovendo o recrutamento e otimizando o reparo tecidual em feridas de camundongos diabéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da PBM no recrutamento de pericitos em feridas realizadas em modelo murino sob condição sistêmica análoga ao DM tipo II.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Caracterizar a amostra quanto aos parâmetros da condição diabética;

3.2.2 Comparar as áreas das feridas submetidas ou não a PBM através de análises morfométricas;

3.2.3 Quantificar e comparar a perfusão sanguínea nas feridas que receberam a PBM ao grupo controle;

3.2.4 Rastrear e quantificar pericitos por microscopia confocal em feridas de animais diabéticos comparando-as ao controle;

3.2.5 Realizar análise microscópica qualitativa dos aspectos morfológicos tecidual durante o reparo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa em Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob protocolo #62/2019. Foram utilizados 18 camundongos C57BL/6 machos de 8-12 semanas de idade, com glicemia ao acaso acima de 300mg/dl após submissão ao método de indução ao DM por estreptozotocina. Foram excluídos animais com peso corporal abaixo de 15g e que não atingiram glicemia ao acaso >300mg/dl.

4.2 Animais transgênicos

Nossa colônia de camundongos transgênicos Nestina+/GFP+ foi mantida homozigótica para o transgene nos camundongos C57BL/6. Estes animais Nestina+/GFP+ foram cruzados com camundongos NG2+/DsRed+ para gerar camundongos duplamente transgênicos Nestina+/GFP + & NG2+/DsRed+. Assim, este modelo apresenta fluorescência endógena para duas proteínas: Nestina+/GFP+, que caracteriza células mesenquimais indiferenciadas (marcadas em verde); NG2+/DsRed+, correspondente a pericitos tipo I (marcadas em vermelho) e dupla marcação Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+, caracteriza os pericitos tipo II (marcados em amarelo). Todos os animais foram alojados em condições controladas de temperatura (24 ° C), sob um ciclo claro-escuro de 12: 12 h e com alimentação livre disponível.

4.3 Grupos experimentais

Trata-se de um estudo *in vivo*, com amostragem por cálculo amostral. Para cada grupo amostral foram utilizados 6 animais diabéticos, sendo duas feridas por animal, onde por convenção, a ferida esquerda foi do grupo PBM e a direita, do grupo controle, totalizando 6 amostras de intervenção e 6 controles para cada tempo experimental. Os tempos experimentais foram de 1, 3 e 7 dias (Quadro 1). Como controle na análise de frutossamina, foram utilizados adicionalmente 4 animais não-diabéticos (ver item 4.8.1) e na análise de

perfusão sanguínea, o controle foi realizado por áreas de pele íntegra nos mesmos animais submetidos a esse experimento (ver item 4.7).

Quadro 1- Distribuição dos grupos amostrais, tipo de intervenção e tempos experimentais.

AMOSTRAS (N)			TEMPOS
	PBM	CONTROLE	EXPERIMENTAIS
(n=6)	Ferida irradiada	Ferida não-irradiada	1 dia
(n=6)	Ferida irradiada	Ferida não-irradiada	3 dias
(n=6)	Ferida irradiada	Ferida não-irradiada	7 dias

Fonte: próprio autor.

4.4 Indução artificial ao DM

O modelo animal diabético na linhagem de camundongos C57Bl/6 Nestina GFP+/NG2 DsRed+ foi desenvolvido de acordo com o estudo de Konrad et al. (2001). Neste protocolo foram administradas doses diárias intraperitoneais (IP) de estreptozotocina (50mg/kg; 1 dose/dia) durante 5 dias. Para a injeção, a mesma em conteúdo sólido, foi pesada na proporção de 50mg/kg e diluída em volume de 50ul de tampão citrato (preparado previamente na proporção de 0,9mL de 0,1M ácido cítrico / 4,1mL de 0,1M citrato de sódio/45mL de água destilada para um volume final de 50mL de solução) para cada animal. Ao fim dos 5 dias de aplicação, os animais foram acompanhados por um período entre 15 a 20 dias, realizando-se o monitoramento de glicemia, peso e sinais clínicos da doença.

Como parâmetros indicativos da condição diabética, foram considerados: 1) o nível glicêmico irreversível > 300mg/dL. Para essa análise, amostras de sangue dos animais foram coletadas periodicamente através da veia caudal e os níveis glicêmicos foram aferidos com o monitor de glicose Accu-Check Active (Roche–Brasil, São Paulo-SP, Brasil); 2) a manifestação de sinais clínicos compatíveis com a tríade do DM, onde os animais foram monitorados periodicamente para observação do consumo excessivo de água, comida e produção de urina, caracterizando polidipsia, polifagia e poliúria, respectivamente; 3) perda de peso, que foi registrada através de pesagem

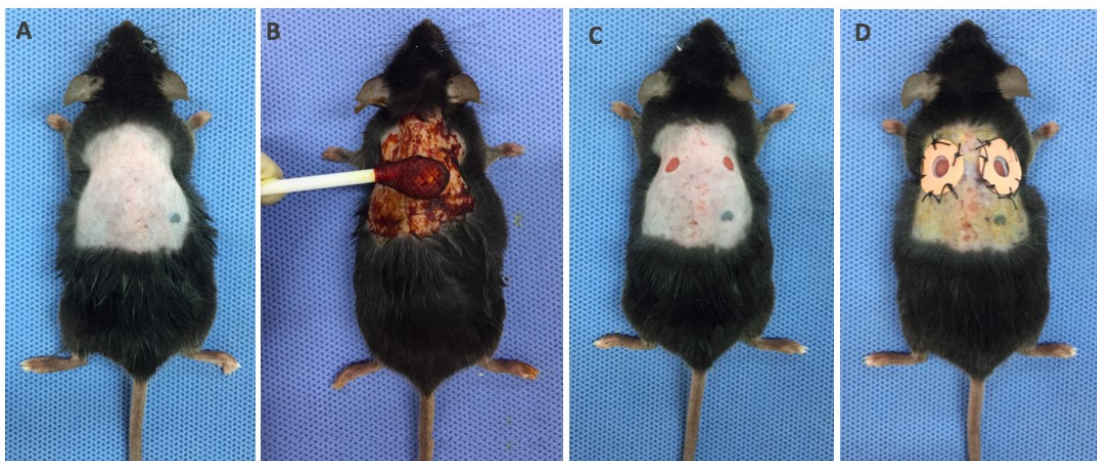
periódica dos animais (início dos experimentos ao pré-operatório); 4) histórico da condição hiperglicêmica, onde ao final dos experimentos, foram realizadas ainda avaliações da permanência crônica do quadro hiperglicêmico, através da avaliação dos níveis de frutossamina. Esta etapa foi realizada após a eutanásia dos animais, uma vez que foi necessária coleta do volume de sangue total dos animais (conforme descrito no item 4.7.1).

Com finalidade de se observar o comportamento das variáveis que podem implicar no êxito do método de indução ao DM, um estudo piloto prévio foi realizado.

4.5 Ferida bilateral e PBM

Após aquisição do modelo experimental diabético, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para realização das feridas. Nesta etapa, os camundongos foram anestesiados [100mg/Kg (ketamina) + 8 mg/Kg (Xilazina); via IP] e as feridas foram realizadas de acordo com Dunn *et al.*, (2013). *Punch* de 4mm de diâmetro foi utilizado e por dobradura da pele dorsal, o *punch* foi inserido de modo a perfurar transversalmente ambas as camadas de pele, assim, foram realizadas duas excisões de espessura total que incluíram o *panniculus carnosus* do dorso, sendo uma excisão em cada lado da linha média do camundongo. Um dispositivo circular de silicone de 0,5 mm de espessura e 5 mm de diâmetro interno foi então colocado circundando cada ferida, presos por sutura em pontos simples (FIGURA 2).

Figura 2- Modelo de feridas



Legenda: A) Remoção dos pelos para exposição da pele; B) Realização da antissepsia; C) Feridas realizadas com *punch* de 4 mm; D) Arruelas de silicone suturadas de modo a evitar fechamento precoce.

Fonte: Autoria própria.

Para cada camundongo, uma ferida recebeu o tratamento com a PBM e a outra foi mantida como controle, observando-se que, durante a aplicação do laser, a ferida controle foi coberta com um anteparo, para evitar irradiação não desejada. A fotoativação foi realizada periodicamente 1 vez por dia, sendo a primeira realizada imediatamente após a cirurgia de realização das feridas e as demais, em todos os dias subsequentes, com duração de aplicação de acordo com o tempo experimental para cada grupo em estudo (1 dia, 3 dias e 7 dias pós-operatório). Para a PBM foi utilizado um laser de diodo de InGaAl (Photon Lase II personalizado; DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), em modo de operação contínuo, com aplicação pontual e em contato. Os parâmetros de dosimetria foram os mesmos utilizados em estudo anterior (DINIZ *et al.*, 2017): 660 nm, 20 mW, 0,71 W/cm², área do feixe de 0,028 cm², 7 s, 0,14 J de energia total por ponto. É importante ressaltar que a PBM não causa dor, nem aumento de temperatura. É um tratamento rápido de apenas 7 segundos. Portanto, os animais não necessitaram ser anestesiados para esse procedimento.

Ao final do procedimento de PBM, foram aplicados adesivos oclusivos do tipo *micropore* em ambas as feridas, para evitar ou minimizar a desidratação. No pós-operatório, cada animal recebeu uma dose analgésica (tramadol 5mg/Kg, via IP) para alívio de dor e conforto pós-cirúrgico. Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o tempo experimental. Um sumário da etapa cirúrgica e aplicação da PBM pode ser observado na Figura 3.

Figura 3- Laser diodo



Legenda: A) Laser de diodo B) Vista lateral da ferida; C) Aplicação da PBM; D) Recobrimento das feridas para evitar ressecamento.

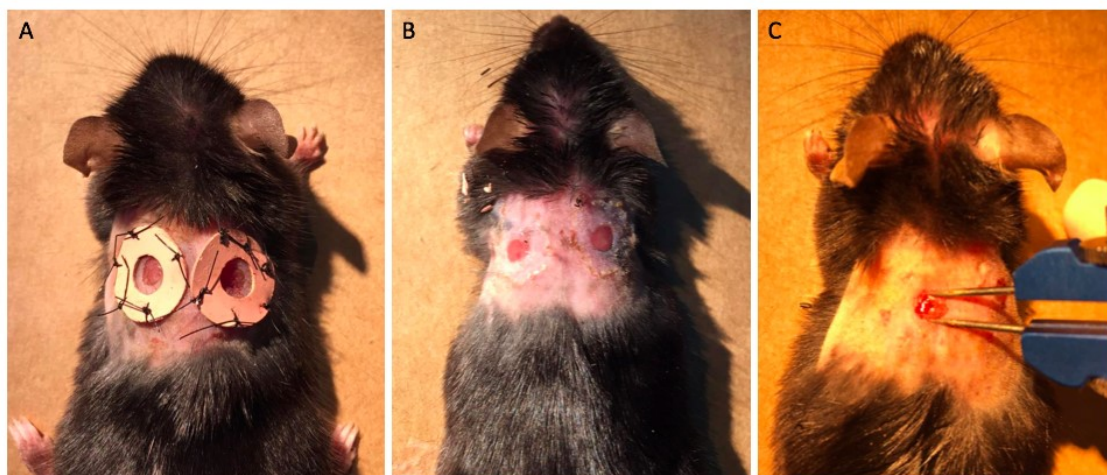
Fonte: Autoria própria.

Em vida, as feridas foram analisadas por medições de diâmetro, para verificar a evolução do reparo e por exame doppler para análise de perfusão sanguínea. As demais análises foram realizadas após eutanásia dos animais nos tempos experimentais específicos de cada grupo.

4.6 Análises morfométricas das feridas

As medições foram realizadas com auxílio de um microcompasso, onde foram mensurados o diâmetro vertical (DV) e horizontal (DH) em milímetros para cada ferida. Essas medidas foram utilizadas para cálculo do diâmetro médio das feridas e em seguida o cálculo da área da circunferência, através da expressão $A = \pi \times r^2$ (A = área; π = 3,14 que é o valor da constante; r = raio), para assim adquirir o valor em percentual da área remanescente em relação a área inicial total da loja cirúrgica (correspondendo a $12,56\text{mm}^2$, ou seja, a ferida inicial possuía 4mm de diâmetro) (FIGURA 4). Além disso, imagens digitais foram tomadas para fins ilustrativos.

Figura 4- Ilustração das medições de diâmetro



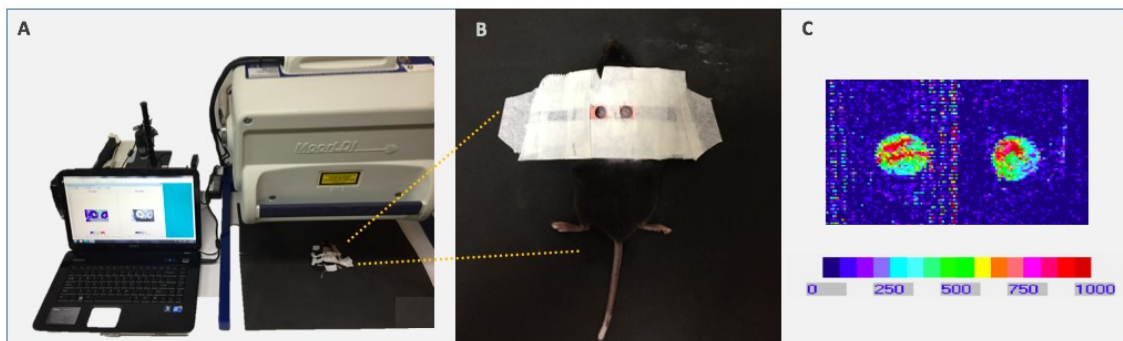
Legenda: Ilustração das medições de diâmetro (DV: diâmetro vertical; DH: diâmetro horizontal). As fotos A, B e C ilustram a sequência no processo de medição das feridas.

Fonte: Autoria própria.

4.7 Perfusão sanguínea (Doppler)

Com finalidade de avaliar o fluxo sanguíneo na área das feridas, a análise de perfusão sanguínea foi realizada por meio de imagens de perfusão, adquiridas com laser Doppler (MoorLID2-IR, *Moor Instruments*, Devon, Reino Unido) (FIGURA 5). Para esta etapa os animais foram anestesiados [100mg/Kg (Cetamina) + 8 mg/Kg (Xilazina), via IP] e submetidos ao doppler nos tempos experimentais de 3 dias e 6 dias. O valor médio dos *pixels* de cada imagem digitalizada foi calculado usando o software Moor LDI V5.3 e expresso como unidades de perfusão, representando assim, o fluxo sanguíneo médio nos locais das feridas. A escolha de realização do doppler nos tempos experimentais 3 dias e 6 dias levou em consideração o tempo total de reparo da ferida, assim, optou-se por selecionar tempos intermediários e equidistantes, compreendidos entre o início do reparo e antes do fechamento total das feridas. Área de pele íntegra foi utilizada como controle para os parâmetros normais de perfusão.

Figura 5- Ilustração do laser Doppler



Legenda: A) Ilustração do laser Doppler; B) Anteparo para delimitação das feridas e realização do exame; C) Ilustração gráfica do resultado do exame doppler em imagem com escala de cores, onde o vermelho indica aumento da perfusão sanguínea.

Fonte: Autoria própria.

4.8 Eutanásia e coleta das amostras

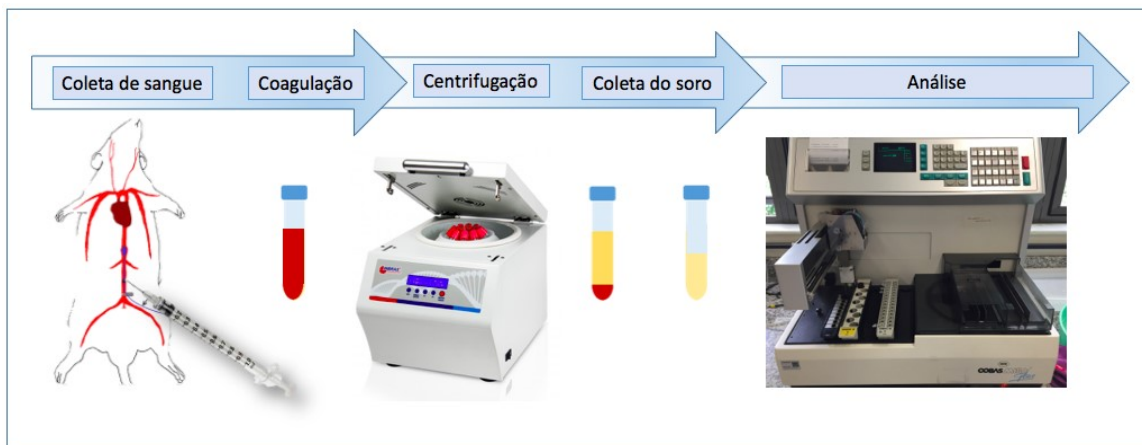
Após os tempos experimentais descritos no início desta sessão, os animais foram eutanasiados. Nesta etapa, foram realizadas coletas de sangue total dos animais para análise de glicemia através das medidas de frutossamina. Em seguida, as amostras de feridas foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4%, por 24h. Após fixadas, metade de cada amostra das feridas foi preparada para inclusão em parafina e a outra metade em meio de preservação para congelamento (OCT., do inglês “*Optimal Cutting Temperature*”), de acordo com a finalidade metodológica.

4.8.1 Amostras de soro (Frutossamina)

Nesta etapa, após coleta de sangue total através de punção na artéria aorta abdominal utilizando seringa e agulha n 22G1 (25mm x 0,70mm). As amostras de sangue permaneceram por 30 minutos sob temperatura ambiente para coagulação, em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000rpm para aquisição do soro, que foi transferido para outro tubo e analisado por meio do Cobas Mira Plus® (Roche –Brasil, São Paulo-SP, Brasil) com o kit Frutossamina (Biotécnica, Varginha – MG, Brasil) de acordo com as instruções do

fabricante (FIGURA 6). Como controle, foram utilizadas amostras de soro de camundongos não-diabéticos (n=4).

Figura 6- Ilustração da coleta do soro



Legenda: Ilustração da sequência de eventos experimentais para coleta e análise sorológica.

Fonte: Autoria própria.

4.9 Hematoxilina & eosina (H&E) e tricrômico de Masson

Para fins de análise da histomorfologia das feridas, as amostras para inclusão em parafina foram inseridas em cassetes e processadas por imersão ascendente em cadeia de álcool (desidratação), seguida de diafanização em xilol, impregnação e finalizadas com inclusão em parafina. Seções de 5 μ m de espessura foram cortadas em micrótomo e montadas em lâminas de vidro. Em seguida, foram desparafinizadas em xilol, reidratadas e coradas com H&E ou tricrômico de Masson. Foram observados os aspectos morfológicos indicativos do estágio de reparo tecidual.

4.10 Microscopia confocal

Com finalidade de localizar e quantificar os pericitos e células indiferenciadas, após coleta e fixação, as amostras selecionadas para crioprocessamento seguiram em imersão em solução de sacarose 15% por 24h e 30% por 24h, seguido de inclusão em OCT e congelamento a -70C até o

momento de confecção das lâminas. As secções de pele em OCT foram cortadas em criostato (espessura de 20 μm), montadas em lâminas de vidro, pós-fixadas em metanol e contrastadas com DAPI (marcador nuclear) diluído em meio de montagem. Após secagem, foram examinadas em microscopia confocal sob objetivas de 4x e 10x. Uma varredura do tipo *scanner* foi realizada para cada amostra, usando a objetiva de 10x. Os pericitos tipo-I, tipo-II e as células indiferenciadas progenitoras neurais foram quantificadas por cálculo da área de fluorescência (valores médios em escala de cinza) usando o software Fiji (National Institutes of Health-NIH, Bethesda, Maryland; EUA). Para esta análise, entre os grupos estudados (1, 3 e 7 dias), foram considerados de interesse observacional apenas os tempos experimentais de 3 e 7 dias. Os valores foram tabulados, plotados em gráficos e análises estatísticas foram realizadas.

4.11 Análises estatísticas

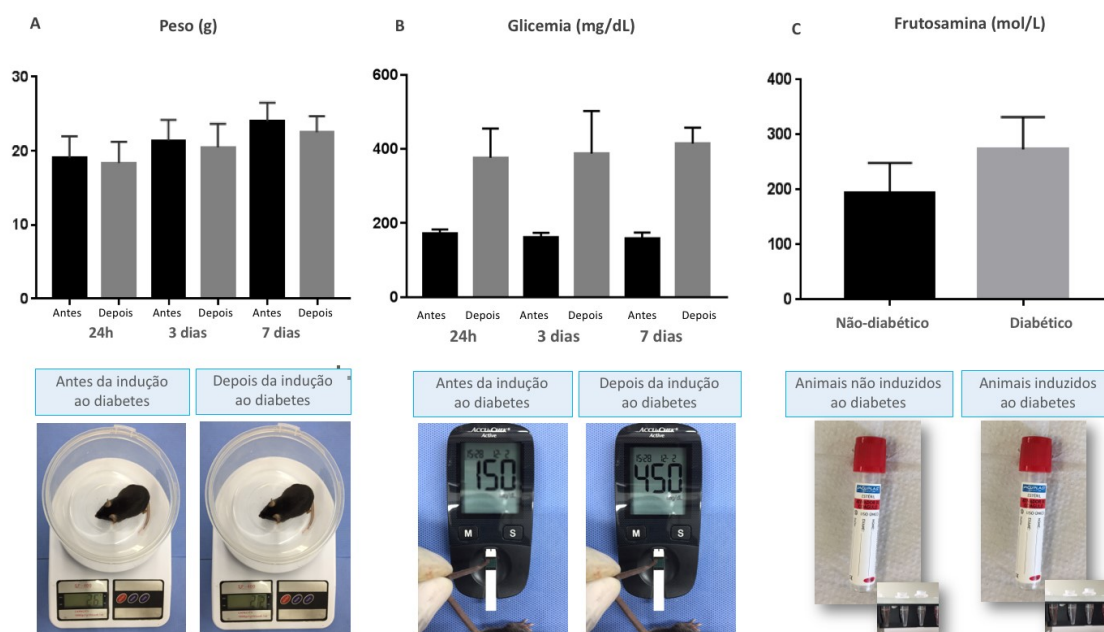
As diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas usando o software *GraphPad Prism* (GraphPad Prism versão 8.0c para MAC, *GraphPad Software*, La Jolla, EUA), considerando-se para a escolha do teste, o tipo de distribuição (normal ou anormal) das amostras e o tipo de análise aplicável (une ou multivariada). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Foi considerado intervalo de confiança de 95% e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Especificamente, para ambas as análises morfométrica e de quantificação celular, foi utilizado o teste *t student*. Para a diferença entre grupos na análise de perfusão sanguínea, utilizou-se ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da indução ao DM

Foram observadas perdas de peso em todos os grupos (FIGURA 7A). Todos os animais apresentaram hiperglicemia, com medida glicêmica >300mg/dL (FIGURA 7B). Concomitante aos valores alterados de glicemia, foram verificados sinais clínicos da tríade da doença (polidipsia, polifagia e poliúria) a partir de 10 a 15 dias após a realização do protocolo de indução do DM. Além disso, a quantificação de frutossamina obteve maiores valores nos animais submetidos ao método de indução ao diabetes, quando comparados a animais não submetidos ao protocolo de indução ao diabetes (controles) (FIGURA 7C).

Figura 7- Peso, glicemia e dosagem de frutossamina dos animais



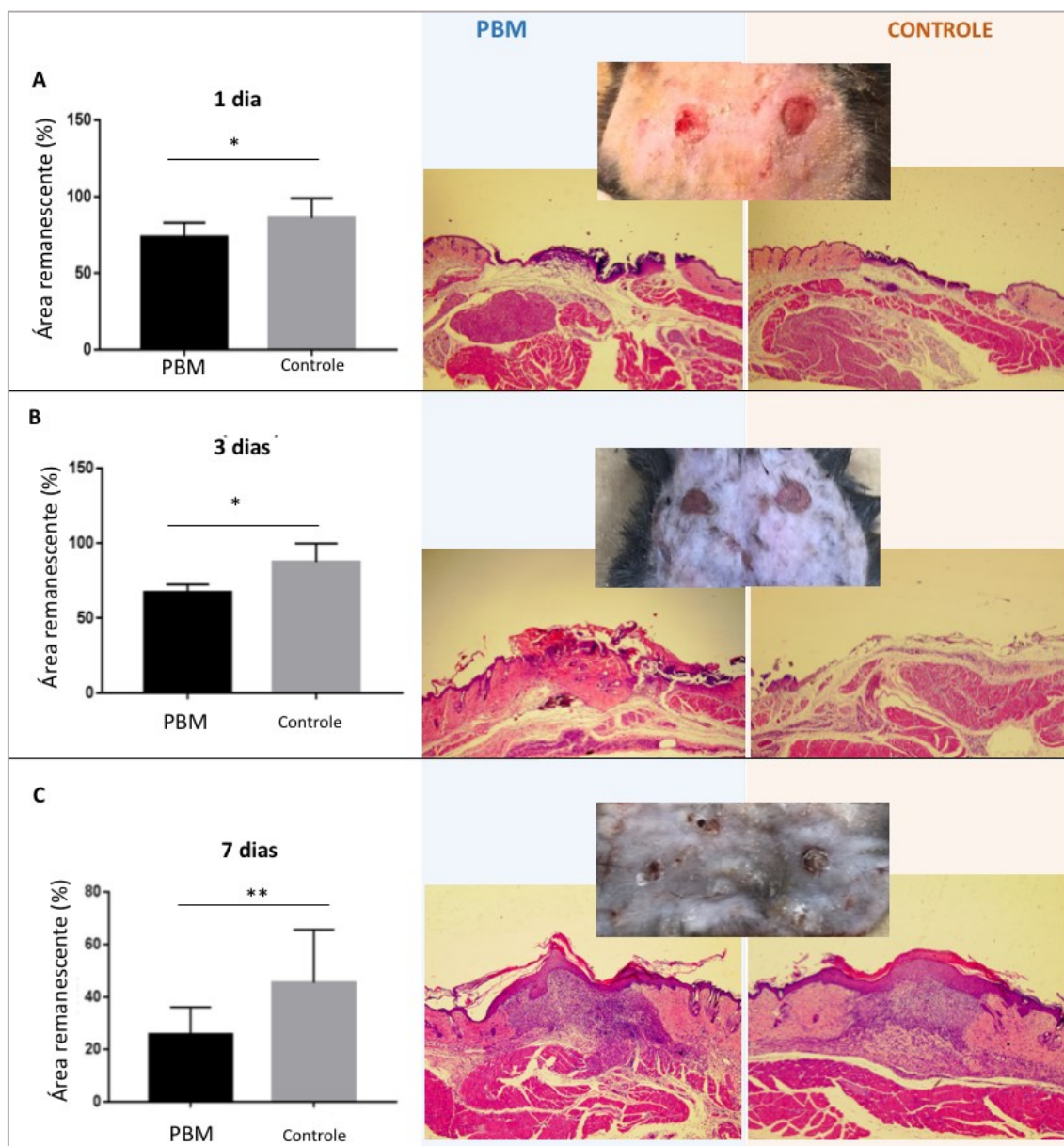
Legenda: A) Peso dos animais antes e depois do processo de indução ao DM, nos 3 diferentes períodos experimentais. B) Glicemia dos animais ao longo dos períodos experimentais. C) Dosagem sorológica de frutossamina dos animais após os períodos experimentais.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Análises morfométricas

No grupo com tempo experimental de 1 dia, a média de área remanescente após aplicação do laser foi 73% da medida de área total inicial da ferida e 86.21% no grupo controle. As amostras (grupos: laser e controle) foram submetidas a análise estatística e apresentaram distribuição normal ($p=0,31$ e $p=0,06$ respectivamente). Assim, foram então submetidas a análise da diferença através do test t student, o qual apresentou significância estatística ($p=0,0257$) (FIGURA 8A).

Figura 8- Análises morfométricas



Legenda: Análises morfométricas em porcentagem (%) de área remanescente nos tempos experimentais 1, 3, 7 dias e perfil clínico/histológico para os respectivos tempos experimentais. A) Mostra a análise morfométrica para o tempo experimental 1 dia; B) Mostra a análise morfométrica para o tempo experimental 3 dias; e C) Mostra a análise morfométrica para o tempo experimental 7 dias; onde (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$) após análise pelo teste *t student*.

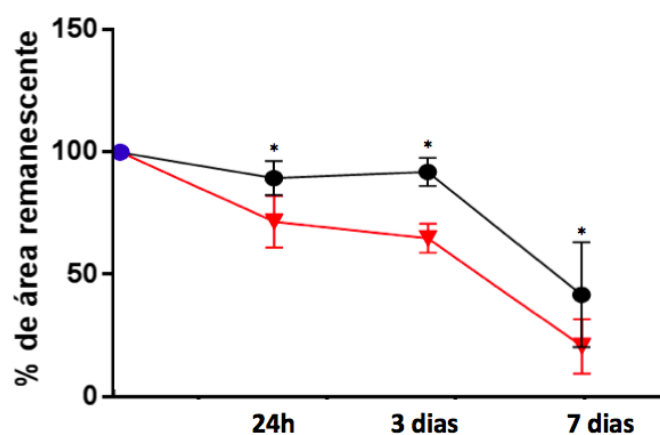
Fonte: Autoria própria.

No tempo experimental de 3 dias, a média de área das feridas foi correspondente a 66,98% da medida de área total inicial no grupo que recebeu a PBM e 87.49% para o grupo controle. As amostras apresentaram distribuição normal ($p=0,09$ e $p=0,34$ respectivamente), em seguida foram submetidas a análise através do teste *t student*, o qual evidenciou diferença estatística entre os grupos ($p=0,026$) (FIGURA 8B).

No tempo experimental de 7 dias, a média de área das feridas submetidas a PBM e controle foram 25,54% e 39.43% da medida de área total inicial, respectivamente. Na análise estatística apresentaram distribuição normal ($p=0,08$ e $p=0,3$ respectivamente), portanto, foram submetidas a análise através do teste *t student*, o qual apresentou significância estatística ($p < 0,05$) (FIGURA 8C).

O perfil de reparo, considerando a redução de área das feridas nos três tempos experimentais pode ser melhor observado na Figura 9.

Figura 9- Análise morfométrica em gráfico de linhas



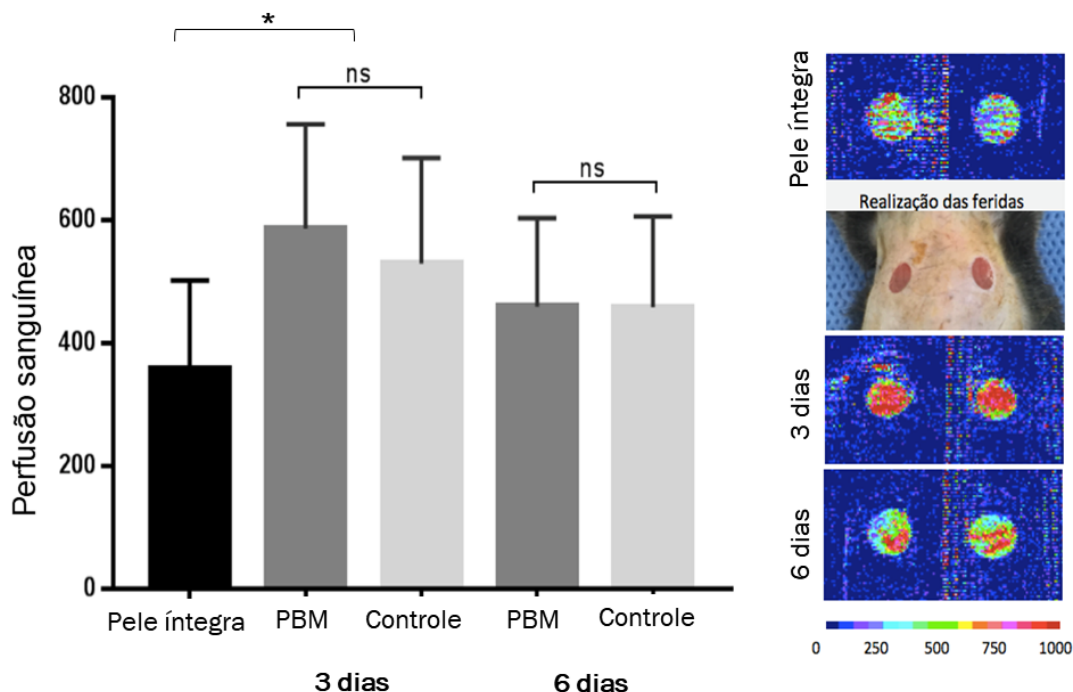
Legenda: Análise morfométrica nos tempos experimentais 1, 3 e 7 dias. A linha em vermelho corresponde às medidas de áreas remanescentes nas feridas submetidas a PBM e em preto, as medidas para feridas do grupos controles, onde (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$) após análise pelo teste *t student*.

Fonte: Autoria própria.

5.3 Análise de perfusão sanguínea

A média da perfusão sanguínea nas áreas das feridas foi maior somente no grupo 3 dias, quando comparadas a pele íntegra ($p = 0.0034$; $p = 0.0483$) e aos grupos dos tempos experimentais 6 dias. Além disso, não houve diferença estatística intragrupo, ou seja, entre ferida irradiada (PBM) e ferida que não recebeu aplicação do laser (controle) em ambos os grupos ($p > 0,05$) (FIGURA 10).

Figura 10- Ilustrações gráficas das análises de perfusão sanguínea



Legenda: Ilustrações gráficas das análises quantitativas de perfusão sanguínea a partir das imagens adquiridas, correspondentes aos locais das feridas nos grupos PBM e controle, para os tempos experimentais 3 e 6 dias. A cor vermelha

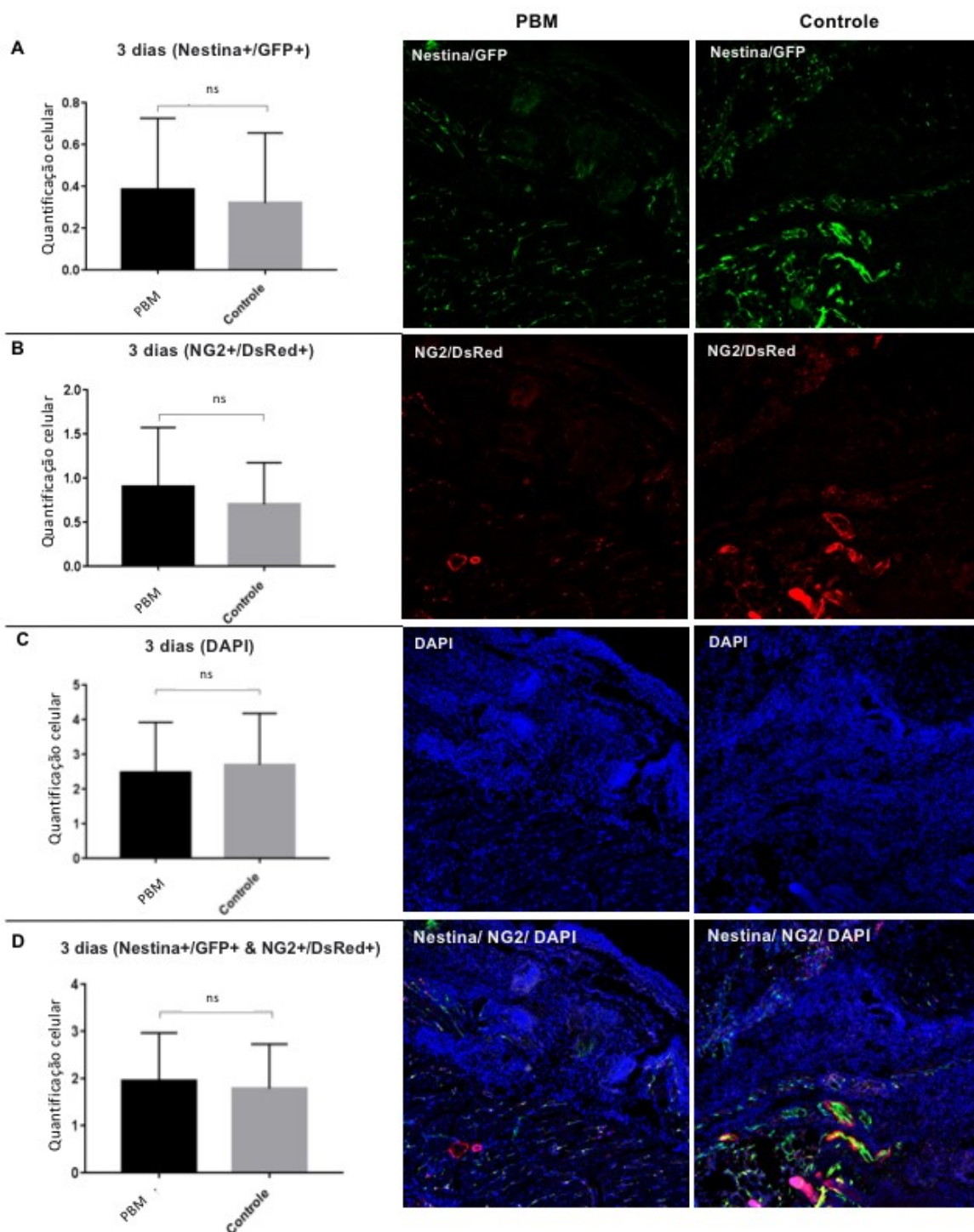
ou cores próximas a ela indicam aumento da perfusão. Na análise, “ns” representa ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) e (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$), após análise de variância (One-way ANOVA).

Fonte: Autoria própria.

5.4 Quantificação de pericitos

Na identificação e quantificação celular, , não foram observadas diferenças estatísticas em quantidades para nenhum dos tipos celulares estudados, em até 3 dias de irradiação (PBM) quando comparado ao controle (FIGURA 11).

Figura 11- Quantificação de pericitos no tempo experimental 3 dias



Legenda: Análise quantitativa das células no tempo experimental 3 dias. A) Quantificação de células precursoras neurais indiferenciadas (Nestina+/GFP+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,83$). B) Quantificação de pericitos tipo I (NG2+/DsRed+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,52$). C) Quantificação da marcação nuclear (DAPI) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,18$). D)

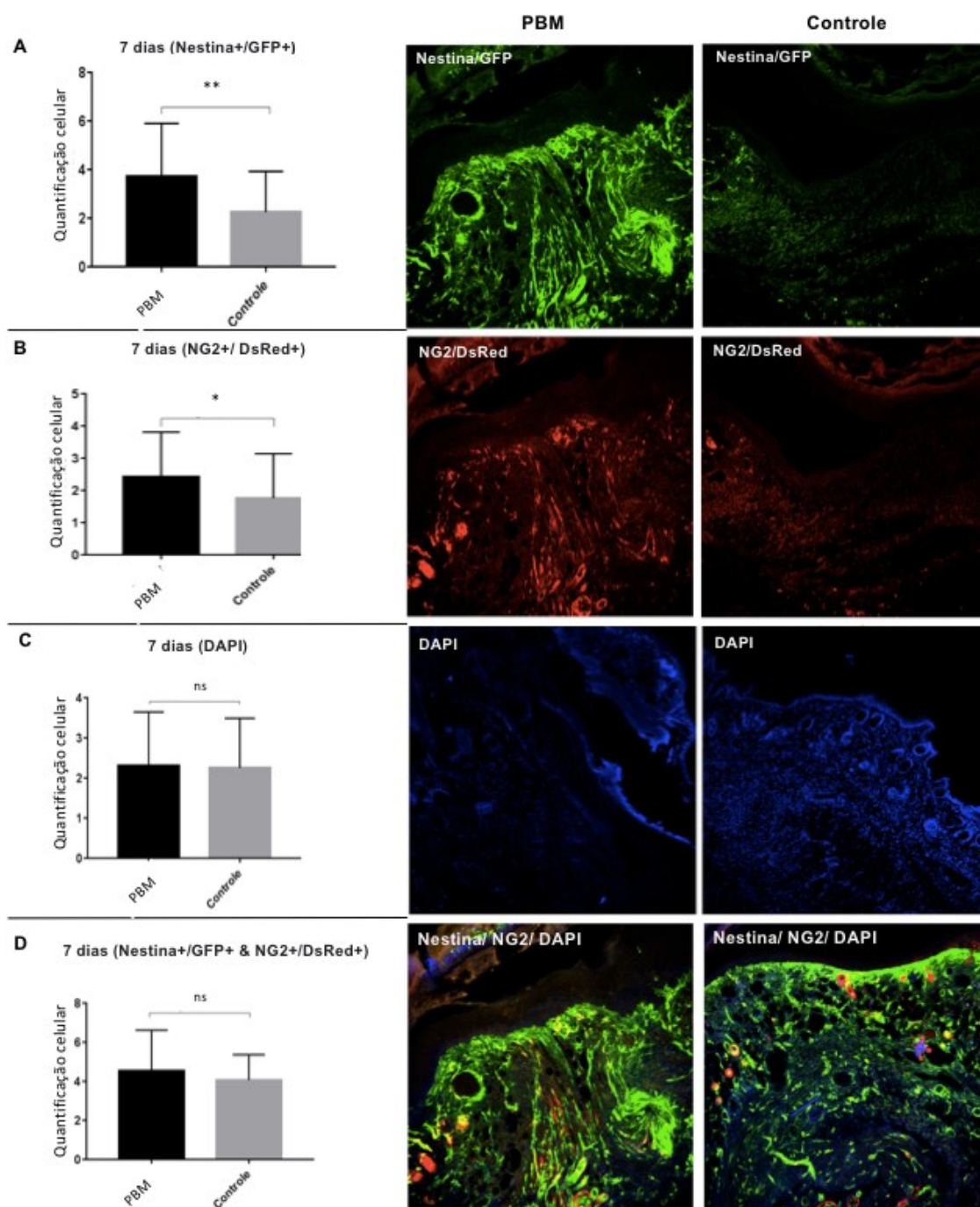
Quantificação da marcação dos pericitos tipo II (Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,72$). Onde “ns” representa ausência de diferença estatística ($p>0,05$), após análise pelo teste *t student*.

Fonte: Autoria própria.

Por outro lado, quando analisadas após 7 dias de PBM, foi observado predominância de células precursoras neurais indiferenciadas (Nestina+/GFP+) por toda extensão do leito das feridas. Além disso, o grupo PBM apresentou maior quantidade das mesmas, quando comparado ao grupo controle ($p=0,01$) (FIGURA 12A). Os pericitos tipo 1 (NG2+/DsRed+) foram as segundas células mais abundantes, considerando os três tipos celulares avaliados. Além disso, apresentou-se em maior quantidade no grupo PBM em relação ao controle ($p=0,03$) (FIGURA 12B).

Não houve diferença significativa entre PBM e controle para a marcação nuclear (DAPI) ($p=0,17$) (FIGURA 12C). Enquanto que os pericitos tipo II (Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+) apresentaram-se em menor quantidade nas feridas e também não apresentaram diferença entre PBM e controle ($p=0,74$) (FIGURA 12D).

Figura 12- Quantificação de pericitos no tempo experimental 7 dias



Legenda: Análise quantitativa das células no tempo experimental 7 dias. A) Quantificação de células precursoras neurais indiferenciadas (Nestina+/GFP+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,01$). B) Quantificação de pericitos tipo I (NG2+/DsRed+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,03$). C) Quantificação da marcação nuclear (DAPI) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,17$). D) Quantificação da marcação dos pericitos tipo II (Nestina+/GFP+ &

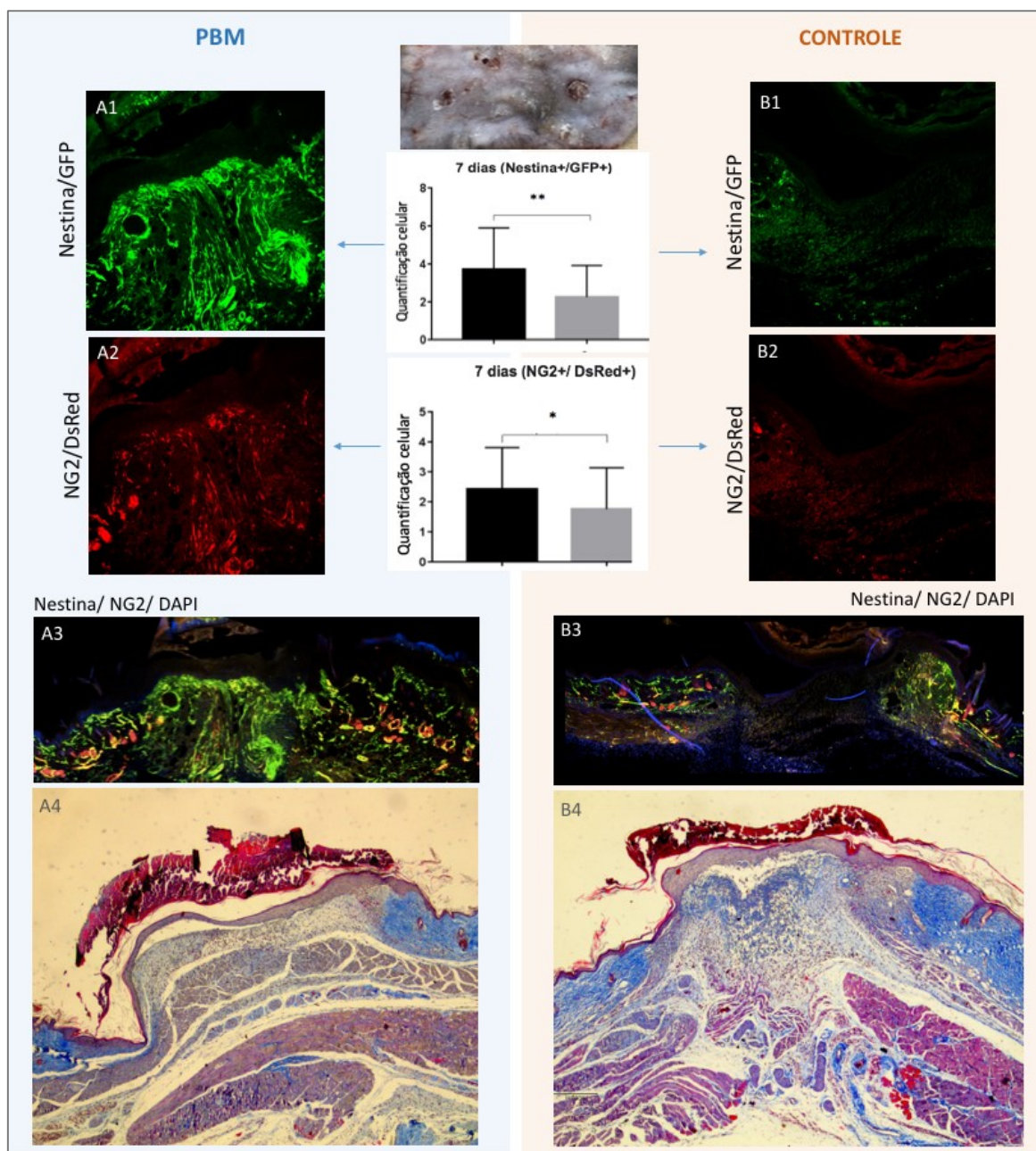
NG2+/DsRed+) em feridas submetidas a PBM, comparadas ao controle ($p=0,74$). Onde “ns” representa ausência de diferença estatística ($p>0,05$), e (*) representa diferença estatística $p<0,05$, (**) representa diferença estatística com $p<0,01$; após análise pelo teste *t student*.

Fonte: Autoria própria.

5.5 Análises histológicas

O aspecto histológico revela feridas em diferentes estágios no processo de reparo tecidual (FIGURA 13, A4 e B4). O padrão de fluorescência indicativo de migração celular é compatível com a fase do reparo tecidual observado na histologia das feridas, quando comparados PBM ao controle, conforme ilustra a Figura 13 (A3 e B3). Ambas as feridas mostram o início do processo de reepitelização, caracterizada pela presença de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. No entanto, na lâmina própria, é possível observar que enquanto a ferida controle ilustrada mostra um padrão de organização semelhante a fase inflamatória crônica, caracterizada por abundante infiltrado inflamatório mononuclear, a ferida submetida a PBM já encontra-se em um estágio de menor quantidade de células inflamatórias e padrão de completa reepitelização e maturação tecidual.

Figura 13- Associação do padrão de fluorescência com o aspecto histológico



Legenda: Ilustração comparativa dos principais achados deste trabalho, apresentando o resultado clínico, a marcação por microscopia confocal e o padrão histológico. As figuras mostram a associação do padrão de fluorescência indicativo da migração celular (nestina+/GFP+; e NG2+/DsRed+) com o aspecto histológico das feridas coradas em tricrômico de Masson em aumento de 10x no tempo experimental 7 dias. A) Ilustram as feridas que foram submetidas a PBM; B) Ilustram as feridas controle; A1) Ilustra a marcação para nestina, sob filtro GFP; A2) Ilustra a marcação para NG2, sob filtro DsRed; A3) Ilustra a ferida completa e a sobreposição dos filtros GFP, DsRed e DAPI indicando a marcação

para os três subtipos celulares investigados; A4) Ilustra o perfil histológico da ferida PBM em 7 dias de tratamento. B1) Ilustra a marcação para nestina, sob filtro GFP; B2) Ilustra a marcação para NG2, sob filtro DsRed; B3) Ilustra a ferida completa e a sobreposição dos filtros GFP, DsRed e DAPI indicando a marcação para os três subtipos celulares investigados; B4) Ilustra o perfil histológico da ferida controle em 7 dias de tratamento.

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

A falha ou atraso no processo de reparo tecidual em diabéticos tem sido alvo de muitos estudos, pois resulta em grande impacto na vida dos indivíduos, assim com gera altos custos para os sistemas de saúde com tratamentos prolongados de feridas não reparadas.

Na Odontologia, pacientes diabéticos não-diagnosticados ou com diabetes descompensado, quando submetidos a procedimentos cirúrgicos, podem apresentar atraso no reparo tecidual e maior risco a infecções secundárias, por retardo no reparo tecidual, especificamente envolvendo a fase inflamatória, onde há resposta imunológica a possíveis infecções (NADER *et al.*, 2006). Desta forma, entender o mecanismo de reparo tecidual e meios de acelerar este processo em indivíduos com DM, se apresenta como uma estratégia para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados e otimização do orçamento público em saúde. Nesta perspectiva, a PBM que já é uma tecnologia auxiliar na recuperação dos pacientes, tem sido bastante estudada, no entanto, ainda se faz necessário conhecer melhor as vias de sinalização e tipos celulares envolvidas neste processo de reparo tecidual sob efeito da PBM, para que se tenha melhor domínio desta ferramenta e se explore melhor o potencial desta terapia, especialmente para aplicação em indivíduos diabéticos.

Nosso estudo investigou a PBM e seus efeitos em feridas de animais diabéticos em aspectos morfológicos (tamanho das feridas) e fisiológicos (migração das células). Os achados mostraram considerável diminuição das feridas e aceleração do reparo tecidual em camundongos diabéticos sob estímulo da PBM, ao longo dos tempos experimentais, entre 1-7 dias.

Através das análises clínicas de medições das feridas, foi possível quantificar o efeito acentuado de reparo tecidual, observado visualmente nos grupos sob PBM em comparação aos controles, confirmados também nos achados histológicos, onde foram observadas diferenças qualitativas nos estágios de reparo tecidual entre as feridas submetidas a PBM, comparadas as feridas controles. Principalmente aos 7 dias, onde se observou nas feridas submetidas a PBM, menos infiltrado inflamatório mononuclear e melhor padrão de organização tecidual, caracterizando os estágios finais do

reparo/cicatrização. É comum que no DM a falha no progresso através das fases normais de cicatrização resulte em feridas crônicas, que muitas vezes parecem estagnar na fase inflamatória (KAJAGAR *et al.*, 2012; KHORAMI *et al.*, 2015). No entanto, nas feridas sob PBM, esse evento parece ter sido amenizado.

Esses achados corroboram com os resultados reportados na literatura, em diversos desenhos de estudos. Em estudo *in vitro*, com células em condição diabética submetidas a PBM, foi reportado aumento da migração celular, proliferação e viabilidade (SEKHEJANE, HOURELD, ABRAHAMSE, 2011; HOURELD, ABRAHAMSE, 2007), produção de colágeno (KAJAGAR *et al.*, 2012) adenosina trifosfato (ATP), concentração de mitocôndrias e citocromo-c oxidase (HOURELD, MASHA, ABRAHAMSE, 2012), além de diminuição da apoptose e citocinas pró-inflamatórias (HOURELD, MASHA, ABRAHAMSE, 2012).

Em estudo realizado por Kajagar *et al.*, (2012) com 68 pacientes diabéticos tipo II, os resultados mostraram redução no tamanho de úlceras em 40,24% para feridas tratadas com PBM, em comparação com 11,87% no grupo controle.

A análise morfométrica/ clínica é um excelente parâmetro de verificação do efeito da PBM nas feridas, no entanto, a grande questão é elucidar como essa resposta clínica está acontecendo a nível celular. Para isso, algumas análises mais detalhadas foram necessárias, portanto, foram realizadas em nosso estudo a identificação e quantificação de populações celulares ali encontradas, como ferramentas para compreender melhor os eventos celulares, no que diz respeito a interação entre PBM e as células locais com potencial de reparo tecidual (pericitos tipo I: NG2+/DsRed+; pericitos tipo II: Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+; e células mesenquimais indiferenciadas: Nestina+/GFP+).

Um dos eventos celulares importantes que podem ser modulados pela PBM é a angiogênese. A angiogênese é um processo essencial para o reparo tecidual, e é um evento precoce que viabiliza a nutrição e oxigenação ao novo tecido em formação. A análise de perfusão sanguínea neste estudo, mostrou pequeno aumento do fluxo vascular nas regiões de ferida, quando comparadas a pele íntegra, além disso, não houve diferença entre feridas submetidas a PBM e controles, em animais diabéticos. Em contrapartida, Do Valle *et al.*, (2020) em estudo com animais não-diabéticos, reportou considerável aumento de perfusão

sanguínea em feridas submetidas a PBM, quando comparadas aos controles. Apesar dessa relevante resposta angiogênica proporcionada pela PBM em animais não-diabéticos reportada na literatura, em nosso estudo, com animais diabéticos, esse efeito da PBM foi menos expressivo em relação ao controle.

Tratando-se de DM e angiogênese, é válido ressaltar que as células endoteliais, - extremamente importantes para a neoformação vascular- podem estar funcionalmente alteradas no DM, comprometendo, portanto, esse evento vascular. Isso se deve ao fato que, no metabolismo normal das células endoteliais, em indivíduos saudáveis, a glicose entra nestas células através do receptor GLUT-1, de maneira independente da insulina. A produção de energia ocorre principalmente por glicólise, em vez de por fosforilação oxidativa. Durante a função endotelial normal, parte da glicose-6-fosfato produzida durante a glicólise é desviada para a via da pentose fosfato. O objetivo dessa via é produzir NADPH, um importante antioxidante nas células endoteliais, bem como pentoses, que podem ser utilizadas para produzir ácidos nucleicos, nucleotídeos e aminoácidos. Também permite a conversão de dissulfeto de glutathione (GSSG) de volta em glutathione (GSH), o que ajuda a prevenir o estresse oxidativo ao converter H_2O_2 em H_2O . Na condição hiperglicêmica crônica presente no DM, existe um desarranjo metabólico induzido por hiperglicemia em células endoteliais, onde a entrada de glicose-6-fosfato na via da pentose fosfato é inibida. Isso causa uma redução na produção de NADPH e um acúmulo de H_2O_2 , que contribuem para o estresse oxidativo nas células endoteliais diabéticas (KNAPP, TU, WU, 2019).

A hiperglicemia no diabetes também diminui a vasodilatação por meio da diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e da prostaciclina (PGI₂). Além de causar aumento nos fatores de contração derivados do endotélio, incluindo prostanóides, endotelina-1 (ET-1), angiotensina-II (Ang-II), dinucleotídeo uridina adenosina tetrafosfato (UP4A), ROS e prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX) (KNAPP, TU, WU, 2019).

Neste sentido, é possível que o processo de angiogênese estimulado pela PBM possa ser limitado por esta condição sistêmica (DM), relacionada principalmente a disfunção endotelial encontrada no DM, repercutindo diretamente na capacidade proliferativa destas células, o que pode explicar também, em parte, o atraso no processo de reparo tecidual, mesmo sob estímulo

da PBM. Pois, quando comparamos o desempenho da PBM na diminuição de área das feridas em animais não-diabéticos, reportado por Do Valle *et al.*, (2020) ($\leq 20\%$ de área remanescente após 7 dias), aos achados do presente estudo – em animais diabéticos, utilizando a mesma espécie de camundongos e o mesmo modelo experimental-, verificamos menor desempenho da PBM no reparo das feridas diabéticas (25,54% de área remanescente após 7 dias), mas ainda assim a PBM se mostrou eficiente, pois apresentou desempenho significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparada ao seu controle diabético (39,43% de área remanescente após 7 dias).

As vias de sinalização no DM relacionadas ao reparo tecidual são bastante complexas. Um dos principais eventos celulares relacionados a lentificação do processo de reparo tecidual em diabéticos é a disfunção endotelial, causada pela condição hiperglicêmica crônica, que resulta em microangiopatia e mais recentemente tem se investigado o efeito do dano endotelial sobre os pericitos (WARMKE, GRIFFIN, CUBBON, 2016). Sabe-se que a ativação dos RKTs (do inglês: *receptor tyrosine kinase*) promove a estimulação de várias vias de sinalização para os processos de captação de glicose celular, proliferação e migração (KHORAMI *et al.*, 2015), no entanto, sua capacidade de estimular reparo tecidual pode ser comprometida em situações de grandes feridas, infecção e doenças sistêmicas como o DM (CASTILHO, SQUARIZE, GUTKIND, 2013).

O DM também pode alterar a ativação de várias outras vias de sinalização, incluindo a do receptor do fator de crescimento epidérmico/ PI3K/ AKT e sinal extracelular de quinases reguladas (EGFR / PI3K / AKT e ERKs) e Bcl2, com sinalização positiva do promotor de morte celular. Isso resulta em aumento da apoptose celular e diminuição da proliferação, levando a atrasos de cicatrização de feridas (XU, YU, 2011). Emanuelli *et al.*, (2016), verificou que a proliferação e migração de fibroblastos diminuída no DM é devido, não apenas à condição de hiperglicemia, mas de forma concomitante, ao estresse oxidativo que é gerado pela deposição de AGEs (do inglês, *advanced glycation end products*) e proteínas oxidativas alteradas. Além disso, sugere-se que a inibição da proliferação de fibroblastos, migração e a expressão do colágeno são acentuados através do contato com colágeno AGE-modificado, a estimulação da proteína ativada por estresse (p38) e da proteína quinase ativada por mitógeno

(MAPK). Vias de sinalização desreguladas em feridas de diabéticos estão também ligadas a concentrações alteradas de miRNAs, ligados a várias proteínas das vias de sinalização, incluindo as da via PI3K / AKT / mTOR (MOURA, BORSHEIM, CARVALHO, 2014).

Sabendo que há diversas vias de sinalização envolvidas no processo de reparo celular que podem estar alteradas em diabéticos, neste estudo nós avaliamos especificamente as respostas celulares de pericitos (tipo I: NG2+/DsRed+; pericitos tipo II: Nestina+/GFP+ & NG2+/DsRed+) e células mesenquimais indiferenciadas (Nestina+/GFP+), quando sob efeito da PBM.

Enquanto que a literatura reporta a participação de pericitos tipo I e tipo II como protagonistas no reparo tecidual induzido pela PBM em camundongos não-diabéticos (do VALLE *et al.*, 2020), em animais diabéticos a participação dessas células foi pouco evidente.

Neste estudo, em até 3 dias de PBM, na análise confocal, não foi possível perceber efeito de migração celular significativo da PBM, quanto ao recrutamento e aumento do número de células (células mesenquimais indiferenciadas, pericitos tipo I ou tipo II) no local da injúria. No entanto, os efeitos clínicos observados nestes primeiros 3 dias podem estar associados a outros mecanismos estimulados pela PBM, como a via do TGF β 1, que pode ser diretamente ativada pela PBM e está presente em abundância no microambiente das feridas (ARANY *et al.*, 2007, 2014). Essa correlação foi confirmada *in vivo*, sugerindo que a ativação imediata do TGF β pela PBM seja um mecanismo molecular predominante no processo de reparo tecidual, o qual é notadamente acelerado com o uso desta ferramenta terapêutica (ARANY *et al.*, 2007, 2014, 2014b).

Por outro lado, na análise das feridas em animais diabéticos com 7 dias de PBM, as principais células encontradas foram do tipo mesenquimais indiferenciadas (Nestina+/GFP+), além de pericitos tipo I (NG2-DsRed+), mas a segunda, em menor quantidade e não houve diferença para pericitos tipo II entre a PBM e controle. Neste sentido, o mecanismo de reparo tecidual em DM sob efeito da PBM, parece ocorrer de modo distinto do evento em não-diabéticos. Isso possivelmente se deve a incapacidade funcional dos pericitos quando na condição diabética, conforme reportado por Warmke, Griffin e Cubbon (2016), que em estudo sobre a relação de pericitos em doença vascular associada ao

diabetes, reportam uma estreita comunicação (*crosstalk*) entre células endoteliais capilares e pericitos, e apontam que a disfunção endotelial pode repercutir em disfunção dos pericitos e vice-versa.

Os pericitos são células murais que suportam e estabilizam a microvasculatura e estão presentes em todos os leitos vasculares. O *crosstalk* pericito-célula endotelial é essencial tanto na remodelação, quanto na vasculatura quiescente, e essa interação complexa é frequentemente interrompida em condições como DM. Acredita-se que a perda de pericitos seja uma característica inicial da doença microvascular associada ao DM (WARMKE, GRIFFIN, CUBBON, 2016), e bastante estudada para compreensão dos eventos de retinopatia e nefropatia diabéticas (BELTRAMO, PORTA, 2013). Nosso estudo explora, portanto, este evento, na compreensão do processo de reparo tecidual em diabéticos, com um olhar sobre o efeito da PBM nos pericitos, uma vez que essa terapia tem sido reportada na literatura como capaz de acelerar o reparo tecidual, tendo como uma das vias, o recrutamento de pericitos para o leito da ferida em animais não-diabéticos (do VALLE *et. al.*, 2020). Sendo assim, mesmo com o reconhecido potencial da PBM em estimular essas células, foi possível notar a partir dos nossos resultados, que este efeito parece ser limitado no DM.

Por fim, quanto aos métodos utilizados neste trabalho, que implicam diretamente nos seus resultados, é importante ressaltar que, o modelo diabético artificialmente induzido pela estreptozotocina é bastante difundido na literatura, e age por danos as células betas pancreáticas com efeito dose-dependente. Logo, as doses utilizadas neste estudo foram otimizadas para a um dano parcial no pâncreas, assim, os animais não perderam a capacidade total de produção de insulina e a mesma foi apenas diminuída, favorecendo a permanência crônica de um estado hiperglicêmico, sem que se estabelecesse a condição de insulino-dependência, configurando uma condição clínica similar ao que ocorre no DM tipo II em seres humanos. Assim, nosso estudo pretendeu adquirir um modelo em condições sistêmicas similares a estas, com finalidade de compreender melhor a nível celular o reparo tecidual induzido por PBM em camundongos submetidos a estas condições fisiopatológicas análogas ao DM tipo II. No entanto, é válido salientar que o diabetes tipo II em humanos é uma doença crônica, consequente de uma série de eventos, entre eles, a associação forte a

quadros de obesidade ou consumo excessivo de açúcar (SAPRA, BHANDARI, 2021). Portanto, é importante considerar que a indução artificial ao DM desconsidera o longo processo de estabelecimento das vias fisiopatológicas regulares de aquisição da doença, como dieta e fatores genéticos associados. Portanto, caracterizando assim uma limitação deste modelo.

7 CONCLUSÃO

A utilização de PBM em processos de reparo tecidual em modelo diabético de feridas demonstrou resultados significativos tanto clínicos como a nível celular, envolvendo em grande parte as células mesenquimais (nestina+/GFP+) e pericitos (NG2+/DsRed+). Conhecer os mecanismos celulares de ação da PBM em feridas de modelo diabético permite controlar esse processo, além de explorar essa técnica e abrir caminhos para investigação de outras ferramentas e protocolos úteis para o tratamento de feridas nestes indivíduos afetados.

REFERÊNCIAS

ARANY, P. R.; CHO A.; HUNT, T. D.; SIDHU, G.; SHIN K.; HAHM, E.; HUANG, G. X.; WEAVER J.; CHEN A. C.; PADWA B. L.; HAMBLIN, M. R.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; KULKARNI A. B. J.; MOONEY, D. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. **Sci Transl Med**. 28;6(238):238ra69, 2014. doi: 10.1126/scitranslmed.3008234.

ARANY, P. R.; HUANG, G. X.; GADISH, O.; FELIZ, J.; WEAVER, J. C.; KIM, J.; YUEN, W. W.; MOONEY, D. J. Multi-lineage MSC differentiation via engineered morphogen fields. **J Dent Res**. 93(12):1250-7, 2014. doi: 10.1177/0022034514542272.

ARANY, P. R.; NAYAK, R. S.; HALLIKERIMATH, S.; IMAYE, A. M.; KALE, A. D.; KONDAIAH, P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. **Wound Repair Regen**. 15(6):866-74, 2007. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00306.x.

ARANY, P. R. Photobiomodulation: poised from the fringes. **Photomed Laser Surg**. 30(9):507-9, 2012. doi: 10.1089/pho.2012.9884.

ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Dev Cell**. 16;21(2):193-215, 2011. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.

ASAHINA, K.; ZHOU, B.; PU, W. T.; TSUKAMOTO, H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. **Hepatology**. 53(3):983-95, 2011. doi: 10.1002/hep.24119.

BANARJEE, R.; SHARMA, A.; BAI, S.; DESHMUKH, A.; KULKARNI, M.; Proteomic study of endothelial dysfunction induced by AGEs and its possible role in diabetic cardiovascular complications. **J Proteomics**. 187:69-79, 2018. doi: 10.1016/j.jprot.2018.06.009.

BELTRAMO, E.; PORTA, M. Pericyte Loss in Diabetic Retinopathy: Mechanisms and Consequences. **Current Medicinal Chemistry**. 20(26), 2013. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990022>

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cell Mol Life Sci.** 70(12):2059-81, 2013. doi: 10.1007/s00018-012-1152-9.

BIRBRAIR, A.; BORGES, I. D. T.; GILSON SENA, I. F.; ALMEIDA, G. G.; DA SILVA MEIRELLES, L.; GONÇALVES, R.; MINTZ, A.; DELBONO, O. How Plastic Are Pericytes? **Stem Cells Dev.** 15;26(14):1013-1019, 2017. doi: 10.1089/scd.2017.0044.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z. M.; MESSI, M. L.; ENIKOLOPOV, G. N.; MINTZ, A.; DELBONO, O. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. **Stem Cell Res.** 10(1):67-84, 2013. doi: 10.1016/j.scr.2012.09.003.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z. M.; MESSI, M. L.; MINTZ, A.; DELBONO, O. Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. **Clin Sci (Lond).** 128(2):81-93, 2015. doi: 10.1042/CS20140278.

BORGES, I.; SENA, I.; AZEVEDO, P.; ANDREOTTI, J.; ALMEIDA, V.; PAIVA, A.; SANTOS, G.; GUERRA, D.; PRAZERES, P.; MESQUITA, L. L.; SILVA, L. S. B.; LEONEL, C.; MINTZ, A.; BIRBRAIR, A. Lung as a Niche for Hematopoietic Progenitors. **Stem Cell Rev Rep.** 13(5):567-574, 2017. doi: 10.1007/s12015-017-9747-z.

BOUCHARD, B. A.; SHATOS, M. A.; TRACY, P. B. Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 17(1):1-9, 1997. doi: 10.1161/01.atv.17.1.1.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **J Clin Invest.** 117(5):1219-22, 2007. doi: 10.1172/JCI32169.

CAMPBELL, K. J.; PERKINS, N. D. Regulation of NF-kappaB function. **Biochem Soc Symp.** (73):165-80, 2006. doi: 10.1042/bss0730165.

CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; GUTKIND, J. S. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. **Oral Dis.** 19(6):551-8, 2013. doi: 10.1111/odi.12070.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC: National Diabetes Statistics Report, 2017.** Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. Disponível em: < <https://dev.diabetes.org/sites/default/files/2019-06/cdc-statistics-report-2017.pdf>> Acesso em: 05 fev. 2020.

CHALAZONITIS, A.; KALBERG, J.; TWARDZIK, D. R.; MORRISON, R. S.; KESSLER, J. A. Transforming growth factor beta has neurotrophic actions on sensory neurons in vitro and is synergistic with nerve growth factor. **Dev Biol.** 152(1):121-32, 1992. doi: 10.1016/0012-1606(92)90162-a.

CHEN, Y.; JIN, H.; CHEN, P.; LI, Z.; MENG, X.; LIU, M.; LI, S.; SHI, D.; XIAO, Y.; WANG, X.; ZHOU, Z.; BI, D.; ZHOU, R. Haemophilus parasuis infection activates the NF- κ B pathway in PK-15 cells through I κ B degradation. **Vet Microbiol.** 160(1-2):259-63, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.021.

DAMANTE, C. A.; DE MICHELI, G.; MIYAGI, S. P.; FEIST, I. S.; MARQUES, M. M. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.** 24(6):885-91, 2009. doi: 10.1007/s10103-008-0582-y.

D'ANGIO, C. T.; FINKELSTEIN, J. N. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. **Mol Genet Metab.** 71(1-2):371-80, 2000. doi: 10.1006/mgme.2000.3074.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. **Adv Skin Wound Care.** 25(7):304-14, 2012. doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.

DINIZ, I. M. A.; CARREIRA, A. C. O.; SIPERT, C. R.; UEHARA, C. M.; MOREIRA, M. S. N.; FREIRE, L.; PELISSARI, C.; KOSSUGUE, P. M.; DE ARAÚJO, D. R.; SOGAYAR, M. C.; MARQUES, M. M. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. **J Cell Physiol.** 233(6):4907-4918, 2018. doi: 10.1002/jcp.26309.

DO VALLE, I. B.; PRAZERES, P. H. D. M.; MESQUITA, R. A.; SILVA, T. A.; DE CASTRO OLIVEIRA, H. M.; CASTRO, P. R.; FREITAS, I. D. P.; OLIVEIRA, S. R.; GOMES, N. A.; DE OLIVEIRA, R. F.; MARQUIORE, L. F.; MACARI, S.; DO AMARAL, F. A.; JÁCOME-SANTOS, H.; BARCELOS, L. S.; MENEZES, G. B.; MARQUES, M. M.; BIRBRAIR, A.; DINIZ, I. M. A. Photobiomodulation drives pericyte mobilization towards skin regeneration. **Sci Rep.** 6;10(1):19257, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-76243-7.

DUNN, L.; PROSSER, H. C.; TAN, J. T.; VANAGS, L. Z.; NG, M. K.; BURSILL, C. A. Murine model of wound healing. **J Vis Exp.** 28;(75):e50265, 2013. doi: 10.3791/50265.

EDUARDO, F. DE P.; BUENO, D. F.; DE FREITAS, P. M.; MARQUES, M. M.; PASSOS-BUENO, M. R.; EDUARDO, C. DE P.; ZATZ, M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med.** 40(6):433-8, 2008. doi: 10.1002/lsm.20646.

EMANUELLI, T.; BURGEIRO, A.; CARVALHO, E. Effects of insulin on the skin: possible healing benefits for diabetic foot ulcers. **Arch Dermatol Res.** 308(10):677-694, 2016. doi: 10.1007/s00403-016-1686-z.

FABRY, Z.; FITZSIMMONS, K. M.; HERLEIN, J. A.; MONINGER, T. O.; DOBBS, M. B.; HART, M. N. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. **J Neuroimmunol.** 47(1):23-34, 1993. doi: 10.1016/0165-5728(93)90281-3.

FISHER, M. Pericyte signaling in the neurovascular unit. **Stroke.** 40(3 Suppl):S13-5, 2009. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.533117.

FRYKBERG, R.G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle).** 1;4(9):560-582, 2015. doi: 10.1089/wound.2015.0635.

FU, X. L.; DING, H.; MIAO, W. W.; MAO, C. X.; ZHAN, M. Q.; CHEN, H. L. Global recurrence rates in diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes Metab Res Rev.** 35(6):e3160, 2019. doi: 10.1002/dmrr.3160.

GAN, L.; CAO, C.; LI, S. R.; CHAI, L. L.; GUO, R.; XIANG, G. J.; ZHAO, S. W. [Promotion effect of stromal cell-derived factor 1 on the migration of epidermal stem cells in the healing process of frostbite-wound model ex vivo]. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi.** 26(3):212-5, 2010. Chinese.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci.** 16(1):4, 2009. doi: 10.1186/1423-0127-16-4.

GARAVELLO, I.; BARANAUSKAS, V.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. **Histol Histopathol.** 19(1):43-8, 2004. doi: 10.14670/HH-19.43.

GUTHRIE, R. A.; GUTHRIE, D. W. Pathophysiology of diabetes mellitus. **Crit Care Nurs Q.** 27(2):113-25, 2004. doi: 10.1097/00002727-200404000-00003.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys.** 4(3):337-361, 2017. doi: 10.3934/biophy.2017.3.337.

HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². **Photomed Laser Surg.** 25(2):78-84, 2007. doi: 10.1089/pho.2006.990.

HOURELD, N. N.; MASHA, R. T.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates cytochrome c oxidase in stressed fibroblast cells. **Lasers Surg Med.** 44(5):429-34, 2012. doi: 10.1002/lsm.22027.

HOURELD, N. N.; SEKHEJANE, P. R.; ABRAHAMSE, H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. **Lasers Surg Med.** 42(6):494-502, 2010. doi: 10.1002/lsm.20812.

INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION –IDF. nona edição do Diabetes Atlas. Acessado em 05/02/20, disponível em: <https://diabetesatlas.org/en/>

KAJAGAR, B. M.; GODHI, A. S.; PANDIT, A.; KHATRI, S. Efficacy of low level laser therapy on wound healing in patients with chronic diabetic foot ulcers-a randomised control trial. **Indian J Surg.** 74(5):359-63, 2012. doi: 10.1007/s12262-011-0393-4.

KANETO, H.; KATAKAMI, N.; MATSUHISA, M.; MATSUOKA, T. A. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. **Mediators Inflamm.** 2010:453892, 2010. doi: 10.1155/2010/453892.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.** 49(1):1-17, 1999. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

KHAN, M. A. B.; HASHIM, M. J.; KING, J. K.; GOVENDER, R. D.; MUSTAFA, H. A. L.; KAABI, J. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. **J Epidemiol Glob Health.** 10(1):107-111, 2020. doi: 10.2991/jegh.k.191028.001.

KHORAMI, S. A. H.; MOVAHEDI, A.; HUZWAH, K.; SOKHINI, A. M. M. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes, **AMBS** 1 (2015) 46–55, 2015.

KNAPP, M.; Tu, X.; Wu, R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. **Acta Pharmacol Sin.** 40, 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0042-6>

KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, C. G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. **Int J Vasc Med.** 2012:918267, 2012. doi: 10.1155/2012/918267.

KONRAD, R. J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J. F.; LIU, K.; KUDLOW, J. E. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochem J.** 356(Pt 1):31-41, 2001. doi: 10.1042/0264-6021:3560031.

LEI, X. X.; XU, P. C.; ZHANG, L.; PANG, M. R.; TIAN, J.; CHENG, B. [Effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on healing of wounds with full-thickness skin defects in mice]. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi.** 34(12):887-894, 2018. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.12.013. Chinese.

LETTERIO, J. J. Murine models define the role of TGF-beta as a master regulator of immune cell function. **Cytokine Growth Factor Rev.** 11(1-2):81-7, 2000. doi: 10.1016/s1359-6101(99)00031-3.

LI, K.; LIANG, Z.; ZHANG, J.; ZUO, X.; SUN, J.; ZHENG, Q.; SONG, J.; DING, T.; HU, X.; WANG, Z. Attenuation of the inflammatory response and polarization of macrophages by photobiomodulation. **Lasers Med Sci.** 35(7):1509-1518, 2020. doi: 10.1007/s10103-019-02941-y.

LIU, F.; LI, X.; WANG, L.; YAN, X.; MA, D.; LIU, Z.; LIU, X. Sesamol incorporated cellulose acetate-zein composite nanofiber membrane: An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing. **Int J Biol Macromol.** 149:627-638, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.277.

LWIN, O. M.; GIRIBABU, N.; KILARI, E. K.; SALLEH, N. Topical administration of mangiferin promotes healing of the wound of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic male rats. **J Dermatolog Treat.** 3:1-10, 2020. doi: 10.1080/09546634.2020.1721419.

MAFRA, DE L. F.; NAVES, K. T.; MACHADO, A. H.; ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A. B.; AIMBIRE, F. Lung inflammation and endothelial cell damage are decreased after treatment with phototherapy (PhT) in a model of acute lung injury induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in the rat. **Cell Biol Int.** 33(12):1212-21, 2009. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.04.025.

MEDRADO, A.; COSTA, T.; PRADO, T.; REIS, S.; ANDRADE, Z. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**. 26(4):192-7, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0781.2010.00521.x.

MEDRADO, A. P.; SOARES, A. P.; SANTOS, E. T.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **J Photochem Photobiol B**. 18;92(3):144-52, 2008. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.05.008.

MILORO, M.; REPASKY, M. Low-level laser effect on neurosensory recovery after sagittal ramus osteotomy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 89(1):12-8, 2000. doi: 10.1016/s1079-2104(00)80006-2.

MOREIRA, M. S.; DINIZ, I. M.; RODRIGUES, M. F.; DE CARVALHO, R. A.; DE ALMEIDA CARRER, F. C.; NEVES, I. I.; GAVINI, G.; MARQUES, M. M. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. **J Photochem Photobiol B**. 166:180-186, 2017. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.022.

MOREIRA, M. S.; VELASCO, I.T.; FERREIRA, L. S.; ARIGA, S. K.; ABATEPAULO, F.; GRINBERG, L. T.; MARQUES, M. M. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. **J Photochem Photobiol B**. 105(3):207-15, 2011. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.09.005.

MOURA, J.; BØRSHEIM, E.; CARVALHO, E. The Role of MicroRNAs in Diabetic Complications-Special Emphasis on Wound Healing. **Genes (Basel)**. 5(4):926-56, 2014. doi: 10.3390/genes5040926.

MULLEN, A. C.; ORLANDO, D. A.; NEWMAN, J. J.; LOVÉN, J.; KUMAR, R. M.; BILODEAU, S.; REDDY, J.; GUENTHER, M. G.; DE KOTER, R. P.; YOUNG, R. A. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. **Cell**. 147(3):565-76, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.050.

NADER, E.; BIANCHINI, I.; GLASENAPP, R.; FERREIRA, S. R. S. Protocolo de Diagnóstico e Acompanhamento de Pessoas com Diabetes Mellitus Tipo 2 em Serviços de Atenção Primária à Saúde. **Grupo Hospitalar Conceição**, versão 5, Porto Alegre, 2006.

OYEBODE, O.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Photobiomodulation in diabetic wound healing: A review of red and near-infrared wavelength applications. **Cell Biochem Funct**. 39(5):596-612, 2021. doi: 10.1002/cbf.3629.

- PALLONE, T. L.; ZHANG, Z.; RHINEHART, K.; Physiology of the renal medullary microcirculation. **Am J Physiol Renal Physiol**. 284(2):F253-66, 2003. doi: 10.1152/ajprenal.00304.2002.
- PASTORE, D.; PETRAGALLO, V. A.; GRECO, M.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. The effect of He-Ne laser light on the mitochondrial cytochrome c oxidase, In: G. Galletti, L. 1992.
- PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. DE P.; MATSON, E.; MARQUES, M. M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med**. 31(4):263-7, 2002. doi: 10.1002/lsm.10107.
- POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A; SOUDRY, M; JACQUEMIER, J; KOPP, F; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **Am J Pathol**. 137(1):171-8, 1990.
- PRAZERES, P. H. D. M.; SENA, I. F.G.; BORGES, I. D. T.; DE AZEVEDO, P. O.; ANDREOTTI, J. P.; DE PAIVA, A. E.; DE ALMEIDA, V. M.; DE PAULA GUERRA, D. A.; PINHEIRO DOS SANTOS, G. S.; MINTZ, A.; DELBONO, O.; BIRBRAIR, A. Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue. **Dev Biol**. 1;427(1):6-11, 2017. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.001.
- SAPRA, A.; BHANDARI, P. Diabetes Mellitus. [Updated 2021 Sep 18]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
- SEKHEJANE, P. R.; HOURELD. N. N.; Abrahamse, H. Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro. **Photomed Laser Surg**. 29(8):521-30, 2011. doi: 10.1089/pho.2010.2877.
- SIMON, C.; LICKERT, H.; GÖTZ, M.; DIMOU, L. Sox10-iCreERT2 a mouse line to inducibly trace the neural crest and oligodendrocyte lineage. **Genesis**. 50(6):506-15, 2012. doi: 10.1002/dvg.22003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Atlas IDF- Diabetes no Brasil**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2018/poster-atlas-idf-2017.pdf>> Acessado em: 05 fev. 2020.
- SOUIL, E.; CAPON, A.; MORDON, S.; DINH-XUAN, A. T.; POLLA, B. S.; BACHELET, M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. **Br J Dermatol**. 144(2):260-6, 2001. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04010.x.

- SOUSA, L. R.; CAVALCANTI, B. N.; MARQUES, M. M. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. **Photomed Laser Surg.** 27(1):37-42, 2009. doi: 10.1089/pho.2007.2220.
- SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science.** 346(6212):941-5, 2014. doi: 10.1126/science.1253836.
- TADAKUMA, T. Possible application of the laser in immunobiology. **Keio J Med.** 42(4):180-2, 1993. doi: 10.2302/kjm.42.180.
- VERBEEK, M. M.; WESTPHAL, J. R.; RUITER, D. J.; DE WAAL, R. M. T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions. **J Immunol.** 154(11):5876-84, 1995.
- WANG, T.; ZHANG, X.; LI, J. J. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. **Int Immunopharmacol.** 2(11):1509-20, 2002. doi: 10.1016/s1567-5769(02)00058-9.
- WARMKE, N.; GRIFFIN, K. J.; CUBBON, R. M. Pericytes in diabetes-associated vascular disease. **J Diabetes Complications.** 30(8):1643-1650, 2016. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.08.005.
- WIMMER, R. A.; LEOPOLDI, A.; AICHINGER, M.; WICK, N.; HANTUSCH, B.; NOVATCHKOVA, M.; TAUBENSCHMID, J.; HÄMMERLE, M.; ESK, C.; BAGLEY, J. A.; LINDENHOFER, D.; CHEN, G.; BOEHM, M.; AGU, C. A.; YANG, F.; FU, B.; ZUBER, J.; KNOBLICH, J. A.; KERJASCHKI, D.; PENNINGER, J. M. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. **Nature.** 565(7740):505-510, 2019. doi: 10.1038/s41586-018-0858-8.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- **WHO** (2019a). Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/diabetes>> Acesso em 05 fev. 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- **WHO** (2019b). Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/treating-diabetes-takes-more-than-insulin-senegal-mobile-phone-project-promoting-public-health>> Acesso em 05 fev. 2020.
- WU, J. Y.; CHEN, C. H.; WANG, C. Z.; HO, M. L.; YEH, M. L.; WANG, Y. H. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF-kB activity. **PLoS One.** 8(1):e54067, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054067.

XI, Q.; WANG, Z.; ZAROMYTIDOU, A. I.; ZHANG, X. H.; CHOW-TSANG, L. F.; LIU, J. X.; KIM, H.; BARLAS, A.; MANOVA-TODOROVA, K.; KAARTINEN, V.; STUDER, L.; MARK, W.; PATEL, D. J.; MASSAGUÉ, J. A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. **Cell**.147(7):1511-24, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.032.

XU, K.; YU, F. S. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 52(6):3301-8, 2011. doi: 10.1167/iovs.10-5670.

YUDOVSKY, D.; NOUVONG, A.; SCHOMACKER, K.; PILON, L. Monitoring temporal development and healing of diabetic foot ulceration using hyperspectral imaging. **J Biophotonics**. 4(7-8):565-76, 2011. doi: 10.1002/jbio.201000117.

ANEXO- A

Parecer de aprovação do CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 62/2019**Título do projeto:** PAPEL DA FOTOATIVACÃO NA MODULAÇÃO DE PERICITOS EM MODELO DIABÉTICO DE FERIDAS**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Ivana Marcia Alves Diniz**Unidade:** Faculdade de Odontologia**Departamento:** Departamento de Odontologia Restauradora**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 10/06/2019. Validade: 10/06/2019 à 09/06/2024
Belo Horizonte, 10/06/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br