



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

KARINA ALEXANDRA BATISTA DA SILVA FREITAS

**Efeitos da fotobiomodulação (laser 660nm) no
extravasamento de antraciclina: estudo
experimental**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Enfermagem no Programa de
Pós Graduação em Enfermagem

Orientadora: Prof^a Associada Regina Célia Popim
Coorientador: Prof titular Hélio Langoni
Coorientadora: Dra Eliana Maria Minicucci

**Botucatu
2020**

Karina Alexandra Batista da Silva Freitas

**Efeitos da fotobiomodulação (laser 660 nm) no
extravasamento de antraciclina: estudo
experimental**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Enfermagem no Programa de
Pós Graduação em Enfermagem

Orientadora: Prof^a Associada Regina Célia Popim
Coorientador: Prof titular Hélio Langoni
Coorientadora: Dra Eliana Maria Minicucci

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Freitas, Karina Alexandra Batista da Silva.

Efeitos da fotobiomodulação no extravasamento de antraciclina :
estudo experimental / Karina Alexandra Batista da Silva Freitas. -
Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Regina Célia Popim

Coorientador: Hélio Langoni

Coorientador: Eliana Maria Minicucci

Capes: 40401006

1. Agentes antineoplásicos. 2. Terapia com luz de baixa intensidade.
3. Terapia a laser. 4. Extravasamento de materiais terapêuticos e
diagnósticos. 5. Ratos Wistar.

Palavras-chave: Antineoplásicos; Extravasamento de materiais
terapêuticos e diagnósticos; LASER; Ratos Wistar; Terapia com luz de
baixa intensidade.

Dedicatória

Ao meu esposo Flávio e meus filhos Yasmim e Miguel

*Pra vocês guardei o amor que nunca soube dar,
o amor que tive e vivi sem me deixar
Sentir sem conseguir provar
Sem entregar
E repartir*

*Pra vocês guardei o amor
Que sempre quis mostrar
O amor que vive em mim vem visitar
Sorrir, vem colorir solar
Vem esquentar
E permitir*

*Guardei
Sem ter porque
Nem por razão
Ou coisa outra qualquer
Além de não saber como fazer
Pra ter um jeito meu de me mostrar*

Todo o meu melhor foi guardado pra vocês.

Amo muito vocês!!

Agradecimentos

Agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pela presença divina em minha vida, sustentando-me nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Hermelinda, de dez vidas, onze eu te daria, obrigada por sempre acreditar em mim, me incentivando a ir em busca o meu melhor.

Às minhas irmãs Patrícia e Karen que sempre almejaram a minha vitória, meus sobrinhos Felipe e Marcela, meus cunhados Vagner, Kiko e Fernando, afinal a verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.

À minha irmã Valéria que me ajudou na parte estatística, sem você nada disso seria possível, obrigada por todo o conhecimento que me passou e pela paciência nos momentos mais difíceis.

As minhas afilhadas Maria Alice e Catarina por todos os risos e amor que me proporcionam.

Ao meu pai Antonio, levarei você para sempre em meus pensamentos e em meu coração, saudades.

Às minhas “amigas – irmãs” Cláudia, Elaine e Juliana pelos 30 anos de amizade e por me manterem constantemente em alegria. Que 2021 possamos nos encontrar mais. A verdadeira amizade é eterna e sincera, nasce, cresce, vive e prospera, é transparente.

À minha orientadora Profa Associada Regina Popim, pela oportunidade de convivência, por todos os ensinamentos que me proporcionou, pela paciência e por ter acreditado que esse trabalho daria certo.

À DMC group por fornecer o equipamento para a pesquisa.

À Dra Eliana Minicucci por ter me inserido no “mundo da Luz” e sempre ter acreditado em mim, que nossa parceria perdure por muito tempo.

À Dra Rosane Lizarelli que com todo seu conhecimento e competência me ajudou em um momento muito difícil, devolvendo a alegria e qualidade de vida à minha sobrinha.

Ao Profº titular Hélio Langoni docente responsável pelo Laboratório Experimental de Diagnóstico de Zoonoses, da FMVZ – UNESP, que não mediu esforços para que essa pesquisa acontecesse e disponibilizou o laboratório e toda sua equipe para me ajudar.

Ao Dr. Benedito Menozzi, obrigada é muito pouco pra te dizer! Não tenho como te agradecer por tudo que fez por mim, pela paciência, tempo dedicado e todo auxílio durante a parte experimental. Você mora em meu coração.

As residentes do Laboratório Experimental de Diagnóstico de Zoonoses, da FMVZ – UNESP: Ana, Gabrielle e Evelyn, por sempre estarem prontas pra me ajudar, mesmo que fosse fim de semana e feriado, vocês foram um presente que a pós graduação me deu!

À Eliete Soares, por me ensinar a tirar as melhores fotos!

À minha chefe e amiga Andrezza Belluomini, por entender os momentos de ausência, me dar oportunidades, sempre me apoiando, estimulando e confiando em mim.

À minha equipe maravilhosa do ambulatório de oncologia: a vida é o nosso bem mais precioso, é tão forte e capaz de mudar o mundo. Mas ao mesmo tempo é tão frágil, capaz de terminar em um segundo. Todos os momentos em nossa vida são mágicos, cabe a cada um de nós torna-los mais marcantes. Obrigada pelas sessões de terapia após as 16h. Vocês são minha segunda família. Amo vocês

À todos

Obrigada

Freitas, KABS 2020. Efeitos da fotobiomodulação (laser 660nm) no extravasamento de antraciclina: estudo experimental [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina – UNESP; 2020.

RESUMO

Introdução: A quimioterapia endovenosa é a modalidade de tratamento mais utilizada no combate ao câncer. O extravasamento de antineoplásico é o escape do medicamento vesicante da veia para tecidos subjacentes. O extravasamento de antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina) é o mais temido, por ser ligante ao DNA, com formação de lesões graves e de difícil resolução. Nesse sentido, não há consenso sobre o melhor antídoto a ser utilizado. O Dexrasoxane, no Brasil é utilizado como *off label*. Seu custo é alto e inviável ao sistema público de saúde. A hialuronidase é considerada um potencial antídoto para extravasamento de antraciclinas, modificando a permeabilidade do tecido pela hidrólise do ácido hialurônico, promovendo a reabsorção. A laserterapia de baixa intensidade ou terapia por fotobiomodulação consiste na irradiação de células, podendo levar a ativação de componentes celulares e promover reações químicas específicas, responsáveis por alterar o metabolismo celular. **Objetivo.** Avaliar o efeito do uso de diferentes agentes (hialuronidase tópica, do fotobiomodulação(FBM) e da associação do FBM com a hialuronidase tópica) na prevenção de formação de lesões causadas pelo extravasamento de doxorubicina em modelo animal/ou ratos. **Método.** Foram utilizados 60 ratos adultos Wistar, divididos em quatro grupos de quinze animais: Grupo 1 (Controle, sem antídoto); Grupo 2 (Hialuronidase); Grupo 3 (FBM) e Grupo 4 (Hialuronidase + FBM). Foram aplicados 1mg em 0,5 ml de doxorubicina no subcutâneo do dorso dos animais, induzindo a ferida. Realizada avaliação macroscópica e morfométrica das lesões a cada dois dias por 28 dias. No 30º dia foi realizada a eutanásia e coleta o material para avaliação histológica. **Resultados.** O aparecimento das lesões iniciou-se no oitavo dia após inoculação. Quatro animais do grupo FBM não apresentaram lesões. Na avaliação macroscópica observou-se hiperemia, exsudato, sangramento, os melhores resultados foram associados aos grupos que faziam uso da laserterapia de baixa intensidade e hialuronidase (FBM e FBM+H). Os grupos FBM, FBM+H e H apresentaram resultados semelhantes na formação de crosta. A formação de necrose e edema, ocorreu em todos os momentos avaliados, os animais do grupo L apresentaram menor taxa de necrose. Na avaliação histológica, observou-se que os animais dos grupo FBM e FBM+H apresentaram maior tecido de regeneração com neovascularização e inflamação aguda, indicando uma melhora significativa na cicatrização da ferida. **Discussão.** A FBM, quando aplicada isoladamente foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões, e a combinação da FBM (660 nm- 1joule) com a hialuronidase tópica (65 UTR) mostrou-se eficaz no processo de cicatrização de feridas por extravasamento de DOX com taxas de contração melhores nesse grupo, com percentual de cicatrização de 76,6% e 72,1%, respectivamente. **Conclusão.** Os resultados evidenciaram que a associação da FBM com a hialuronidase promoveu a cicatrização das lesões e que a FBM isolada diminuiu a formação de lesões, denotando um resultado promissor para o uso na prática clínica.

Descritores: Agentes antineoplásicos; terapia com luz de baixa intensidade, terapia a laser; extravasamento de materiais terapêuticos e diagnósticos, Ratos Wistar, fotobiomodulação.

Freitas, KABS 2020. Effects of photobiomodulation (laser 660nm) on anthracycline extravasation: experimental study [Thesis]. Botucatu: Faculty of Medicine - UNESP; 2020.

ABSTRACT

Introduction. Intravenous chemotherapy is the most used treatment modality in the fight against cancer. Antineoplastic extravasation is leakage of vesicant drug from the vein into underlying tissues. The extravasation of anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin) is the most feared, as it binds to DNA, with the formation of severe and difficult-to-resolve lesions. In this sense, there is no consensus on the best antidote to be used. Dexrasoxane, in Brazil is used as off label. Its cost is high and unfeasible for the public health system. Hyaluronidase is considered a potential antidote for extravasation of anthracyclines, modifying tissue permeability through the hydrolysis of hyaluronic acid, promoting reabsorption. Low-intensity laser therapy or photobiomodulation therapy consists of irradiating cells, which can lead to the activation of cellular components and promote specific chemical reactions, responsible for altering cellular metabolism. **Objective.** To evaluate the effect of using different agents (topical hyaluronidase, low-level laser (FBM) and the association of FBM with topical hyaluronidase) in preventing the formation of lesions caused by doxorubicin extravasation in an animal/or rat model. **Method.** Sixty adult Wistar rats were used, divided into four groups of fifteen animals: Group 1 (Control, without antidote); Group 2 (Hyaluronidase); Group 3 (FBM) and Group 4 (Hyaluronidase + FBM). 1mg in 0.5 ml of doxorubicin were applied subcutaneously on the back of the animals, inducing the wound. Macroscopic and morphometric evaluation of the lesions was performed every two days for 28 days. On the 30th day, euthanasia was performed and the material was collected for histological evaluation. **Results.** The appearance of lesions started on the eighth day after inoculation. Four animals in the FBM group showed no lesions. In the macroscopic evaluation, hyperemia, exudate, bleeding were observed, the best results were associated with the groups that used low-level laser therapy and hyaluronidase (FBM and FBM+H). The FBM, FBM+H and H groups showed similar results in crust formation. The formation of necrosis and edema occurred at all times evaluated, the animals in group L had a lower rate of necrosis. In the histological evaluation, it was observed that the animals of the FBM and FBM+H groups showed greater tissue regeneration with neovascularization and acute inflammation, indicating a significant improvement in wound healing. **Discussion.** FBM, when applied alone, was able to prevent the appearance of lesions, and the combination of FBM (660 nm-1joule) with topical hyaluronidase (65 UTR) proved to be effective in the healing process of wounds due to DOX extravasation with rates of contraction in this group, with healing percentage of 76.6% and 72.1%, respectively. **Conclusion.** The results showed that the association of FBM with hyaluronidase promoted wound healing and that FBM alone reduced the formation of lesions, indicating a promising result for use in clinical practice.

Descriptors: Antineoplastic agents; low intensity light therapy, laser therapy; extravasation of therapeutic and diagnostic materials, Wistar Rats, photobiomodulation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
O problema da pesquisa.....	10
Hipótese.....	11
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos.....	11
3. JUSTIFICATIVA.....	12
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
4.1 A pele e os mecanismos de reparo tecidual.....	12
4.2 Antraciclina	14
4.3 Antídotos.....	15
4.4 Fotobiomodulação.....	17
5 MATERIAL E MÉTODO.....	22
5.1 Tipo de Estudo.....	22
5.1.1 Delineamento amostral.....	23
5.2. Procedimento técnico do experimento.....	24
5.2.1 Procedimento para preparo do antineoplásico.....	24
5.2.2 Procedimento anestésico.....	24
5.2.3 Procedimento de extravasamento do antineoplásico DOX.....	25
5.2.4 Procedimentos terapêuticos: aplicação dos antídotos.....	26
5.2.5 Avaliação macroscópica.....	28
5.2.6 Avaliação morfométrica.....	29
5.2.7 Avaliação histológica.....	29
5.2.8 Procedimento de eutanásia/Obtenção da amostra.....	30

5.3 Análise dos dados.....	31
6. RESULTADOS	31
6.1 Avaliação macroscópica.....	32
6.2 Avaliação morfométrica.....	38
6.2.1 Contração da ferida.....	38
6.2.2 Análise histológica.....	40
7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÃO.....	50
9. REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE I.....	61
ANEXO I.....	62

1 INTRODUÇÃO

São estimados para o triênio de 2020-2022 aproximadamente 670 mil novo casos de câncer no Brasil. Estudos indicam que o câncer de pele do tipo não melanoma (170 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (68 mil) e mama feminina (60 mil)⁽¹⁾.

Uma das terapêuticas mais utilizadas e promissoras no tratamento do câncer é a quimioterapia antineoplásica (QTA), caracterizada como uma modalidade de tratamento sistêmico em que os agentes antineoplásicos podem ser tóxicos. Tais drogas, classificadas de acordo com seu potencial de lesão de pele em irritantes, vesicantes e não vesicantes, causam diferentes reações quando extravasadas no tecido cutâneo, durante a quimioterapia. Nesse sentido, um importante aspecto a ser investigado é como evitar complicações referentes ao extravasamento dessas drogas. O extravasamento de uma QTA caracteriza-se pelo escape da droga classificada como vesicante para fora do vaso sanguíneo. Drogas irritantes podem causar reações como ardor, flebite ou dor mesmo quando infundidas adequadamente e raramente causam necrose ou ulceração mesmo quando extravasadas em grandes quantidades. Por outro lado, as vesicantes quando extravasadas causam grandes danos ao tecido subjacente, provocando dor e levando rapidamente a necrose. Diferentemente das drogas citadas anteriormente, as não vesicantes não causam qualquer dano tecidual quando extravasadas^{2,3,4}.

Especificamente, o extravasamento de antraciclinas, como a doxorrubicina (DOX), é considerada uma das mais temidas e frequentes complicações referentes ao tratamento contra o câncer, apresentando uma incidência de aproximadamente 0,1 a 7% em infusão periférica².

A terapia por fotobiomodulação (FBM) ou laserterapia (L) tem sido considerada importante alternativa no tratamento de processos cicatriciais, pois possuem ações anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes. Além disso, não causam efeitos colaterais como aqueles induzidos por alguns fármacos (por exemplo, os corticoides), evidenciando assim, uma

melhora do prognóstico do paciente mais rapidamente^{5,6}.

A hialuronidase é um antídoto muito utilizado no extravasamento de quimioterápicos, no entanto é específico para os vesicantes não ligante ao DNA, embora seja um potencial antídoto para as antraciclinas. Este medicamento modifica a permeabilidade do tecido pela hidrólise do ácido hialurônico e ajuda a dispersar os alcaloides da vinca do tecido (quimioterápicos não ligantes ao DNA), promovendo a reabsorção. Esta enzima é um antídoto recomendado pela *Oncology Nursing Society* (ONS) mas não pela *European Oncology Nursing Society* devido à falta de evidências clínicas^{3,7,8}.

Cabe salientar que não existem estudos associando o uso da FBM e da Hialuronidase tópica na prevenção e tratamento de feridas cutâneas causadas por extravasamento de antraciclina.

Provavelmente, a associação do uso da Hialuronidase e FBM, certamente trarão grande contribuição para o tratamento de feridas cutâneas causadas pelo extravasamento de Antracíclicos.

O problema da pesquisa

Considerando:

- a) que o extravasamento de DOX pode causar lesões graves e incapacitação dos membros acometidos, podendo piorar o prognóstico do paciente;
- b) que o dexrazoxane é o antídoto autorizado pelo FDA para o extravasamento de antraciclinas e que seu custo é extremamente elevado, impossibilitando seu uso na maioria dos centros de quimioterapia;
- (c) ausência de estudos utilizando o FBM na prevenção e tratamento de lesões causadas por extravasamento de DOX;
- (d) ausência de estudos demonstrando a eficácia da hialuronidase tópica como antídoto

para DOX;

Pergunta-se: A associação da FBM com a hialuronidase tópica previne a formação de lesões causadas pelo extravasamento do antineoplásico DOX, bem como diminui as lesões formadas pelo extravasamento desta droga?

Hipótese

- A FBM associada a hialuronidase tópica previne o aparecimento de lesões causadas por extravasamento da DOX;
- A FBM associada a hialuronidase acelera o processo de cicatrização em lesões causadas por extravasamento da DOX, diminuindo a gravidade e o tempo de lesão;

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito do uso de diferentes agentes (hialuronidase tópica, do FBM e da associação do FBM com a hialuronidase tópica) na prevenção de formação de lesões causadas por extravasamento do antineoplásico DOX, bem como na diminuição de lesões formadas pelo extravasamento desta droga.

2.2 ESPECÍFICOS

- Testar o efeito da prevenção de formação de lesões utilizando cada agente proposto e comparar as diferenças entre os grupos pesquisados;
- Avaliar e comparar a evolução das lesões provocadas em cada grupo;
- Avaliar a atividade celular por meio de histologia para cada agente utilizado.
- Confirmar a ocorrência do extravasamento por meio da biópsia.

3 JUSTIFICATIVA

O extravasamento de drogas é um problema sério e de difícil resolução sendo necessários estudos para o maior conhecimento acerca dessa situação.

Cabe salientar que existem estudos do uso da FBM como terapia única ou da hialuronidase tópica na prevenção e tratamento de feridas cutâneas.

Não existem estudos da associação do uso desses dois procedimentos.

Nesse sentido, a associação do uso da Hialuronidase e a FBM, pode ser importante como nova alternativa para o tratamento de feridas cutâneas causadas pelo extravasamento de Antracíclicos.

Espera-se que os resultados advindos do uso da FBM associada a aplicação tópica de hialuronidase no extravasamento de doxorubicina forneça subsídios para a elaboração de um novo protocolo para atendimento desses pacientes.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A pele e os mecanismos de reparo tecidual

A pele é o maior órgão do corpo humano sendo considerada a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos, perda de água, invasão de microrganismos. É composta por 2 camadas distintas: a epiderme e a derme. Logo abaixo da derme encontra-se a hipoderme que é constituída de um tecido subcutâneo adiposo^{9,10}.

A ferida é uma interrupção da continuidade da pele, podendo ser de diversas etiologias: traumática, isquemia, infecção, cirúrgica, por pressão, de tamanho e características variáveis. Quando ocorre um rompimento tecidual inicia-se um processo de reparo complexo com objetivo de restauração do tecido¹⁰.

Não existem dados concretos sobre a prevalência de feridas na população brasileira, porém, existem estudos que estimam a prevalência de indivíduos com tal lesão em 1,05% na

população em geral e de 1,9% entre aqueles atendidos na atenção primária à saúde¹¹.

Após uma lesão, ocorre uma cascata perfeita e coordenada de células e evento moleculares complexos com objetivo de realizar a cicatrização da ferida. Esses eventos são intercedidos e sustentados por um conjunto de mediadores químicos agindo em diferentes fases. Estas, possuem limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo, denominadas: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação^{11,12,13}.

A fase inflamatória tem duração de 48 a 96h após o ferimento ocorrendo hemostasia por meio da ativação da cascata de coagulação, formando o tampão de plaquetas. Há o aumento da permeabilidade vascular com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos evidenciando os sinais físicos do processo inflamatório: eritema, edema, calor e dor. Inicia-se a cascata de reparação por meio do apoio e recrutamento e ativação celular, síntese da matriz extracelular e o início do processo da angiogênese^{9,13,14}.

Já na fase proliferativa os eventos da inflamação promovem a limpeza da ferida por meio da fagocitose. Ocorre de 4 a 12 dias após a lesão e algumas células começam a realizar a epitelização da lesão como os fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e epiteliais. Esse processo é importante pois tem como função a proteção das feridas contra bactérias, agentes físicos e químicos, contra perda de líquidos e eletrólitos e efeitos estéticos^{13,14}.

A remodelação é o último e mais longo processo de cicatrização podendo ser continuado por 12 a 18 meses. A principal característica dessa fase é a presença do colágeno, principal componente da derme. A matriz de colágeno possui aproximadamente 20% de colágeno tipo III, o que a torna extremamente frágil. A mudança para colágeno tipo I é gradual sendo aumentada pelos fibroblastos^{9,13,14}.

Fatores locais e sistêmicos podem ser responsáveis pela diminuição no processo de cicatrização, aumentando o tempo da lesão, tais como: tamanho e localização da ferida, tipo de

tecido presente (necrose, esfacelo), contaminação bacteriana, presença de biofilme, técnica incorreta na realização do curativo, diabetes, doenças auto-imunes, patologias vasculares, uso de corticosteroides, tratamento oncológico (quimioterapia e /ou radioterapia), desnutrição, deficiência de vitaminas. Esses fatores causam um atraso na formação do tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e neovascularização^{9, 10,14}.

4.2 Antraciclinas

As antraciclinas doxorrubicina, idarrubicina, daunorrubicina e epirrubicina são quimioterápicos classificados como antibiótico tumoral. É amplamente utilizado e altamente eficaz para o tratamento de leucemias, linfomas, sarcomas, câncer de mama. Pode ser utilizado em associações com outros antineoplásicos como vincristina, ciclofosfamida, bleomicina, vimblastina, rituximabe, entre outros^{15,16,17}.

Apesar de muito utilizadas e com ótimos resultados, por não ter ação seletiva, são amplamente associadas à efeitos colaterais induzidos por dose cumulativa, como a cardiomiopatia e caquexia, podendo levar a interrupção do tratamento, aumentando a probabilidade de recidiva do câncer¹⁶. São classificadas como quimioterápicos vesicantes ligantes ao DNA, pois se ligam aos ácidos nucleicos dos tecidos, gerando radicais livres, inibindo a síntese de proteínas local. Em casos de extravasamento, provocam a destruição progressiva do tecido fazendo com que a lesão se torne mais profunda, extensa e dolorosa^{2,3,4}.

Particularmente a DOX é a antraciclina mais utilizada no tratamento de diversos tipos de cânceres. No entanto, um evento adverso importante que pode ocorrer durante seu uso, é o extravasamento, que pode causar lesões gravíssimas. A ação da DOX está na formação do complexo DOX-DNA, tanto para a ação no músculo cardíaco, provocando a cardiomiopatia, quanto para o tecido onde foi extravasada. A DOX liga-se no DNA da célula (complexo DOX-DNA) e bloqueia a divisão e o crescimento celular provocando a morte celular e necrose de

tecido. Cada célula que morre libera esse complexo que é absorvido pelas células adjacentes, causando um efeito em cascata. Assim, o extravasamento de DOX leva a uma necrose crônica, progressiva e aumentada⁷.

Desta forma, ocorre a retenção deste quimioterápico no tecido durante longos períodos de tempo, pois fica recirculando no local por meio de ligações de DNA. Pode permanecer por até 28 dias e aumentar a lesão em 5,0 cm a partir do local do extravasamento^{15,18,19}. Um dos mecanismos de lesão induzida por DOX é sugerido ser o estresse oxidativo causado pelo radical semiquinona de DOX. Acredita-se que o mecanismo para a ocorrência desse dano tecidual seja a liberação de radicais livres no tecido. Em geral, o extravasamento da DOX provoca danos ao tecido, variando desde eritema, edema e dor à necrose e ulceração grave da pele. Uma das medidas utilizadas para contornar esta situação é submeter o paciente a cirurgia no local do extravasamento para remediação dos danos teciduais, no entanto, o prognóstico do paciente é grandemente alterado⁷.

A lesão tecidual provocada pelo extravasamento da DOX ou de qualquer outro quimioterápico pode ser minimizada ou até evitada com a utilização do antídoto adequado²⁰.

4.3 Antídotos

Antídotos são agentes químicos que neutralizam ou diminuem os efeitos de um veneno ou medicação. Apesar de vários medicamentos terem sido indicados como tratamento do extravasamento, ainda há muitas controvérsias em relação a sua segurança e eficácia, pois a maioria dos antídotos são recomendados baseando-se em informações empíricas^{8,21}.

O dexrazoxane é o único antídoto cuja eficácia foi testada em ensaios clínicos (por meio de biópsia) para o tratamento de extravasamento de antraciclinas e o único aprovado pelo Food and Drugs Administration (FDA) e pela Comissão Europeia para esse tipo de tratamento. Esta medicação já é utilizada há algum tempo para reduzir a cardiotoxicidade induzida pela

DOX e mais recentemente foi observado o seu efeito benéfico no tratamento de extravasamento das antraciclinas. O mecanismo de ação deste medicamento como antídoto se dá pelo bloqueio da topoisomerase II para que o tecido não seja afetado pela antraciclina. A droga liga-se ao ferro impedindo a formação de radicais livres que tem papel importante na formação de lesões^{3,22}. Como efeitos colaterais provocados por este antídoto podemos mencionar náuseas, vômitos, dor discreta no local da infusão e aumentos reversíveis das enzimas hepáticas²³. Embora estudos demonstrem que dexrazoxane apresenta eficácia de 98% no tratamento do extravasamento por antraciclinas, o uso deste antídoto ainda é inviável para o setor público, devido ao seu alto custo^{4,23}. É comercializado na forma de kits individuais, para tratamento do paciente durante três dias consecutivos. A primeira infusão é realizada num período máximo de 6 horas após o extravasamento^{23,25,26}. A administração ocorre por infusão endovenosa, em veia de grosso calibre no braço oposto, afastado da área de extravasamento²⁷. A dose do antídoto recomendada baseia-se na superfície corpórea do paciente e deve-se aplicar no 1º dia 1000mg/m², no 2º dia 1000mg/m² e no 3º dia apenas 500 mg/m². Concomitantemente ao tratamento, deve ser realizada a monitorização da função renal em pacientes com alteração de creatinina e, se necessário, a dose da dexrazoxane deverá ser reduzida em 50%^{23,25}. Seu uso deve ser monitorizado pois pode apresentar elevações reversíveis de enzimas hepáticas além de neutropenia, trombocitopenia, febre, reações do local de infusão (por exemplo, dor, flebite) e náuseas e vômitos²⁸.

A hialuronidase é muito utilizada no extravasamento de quimioterápicos não ligantes ao DNA, especialmente os alcaloides da vinca, modificando a permeabilidade do tecido pela hidrólise do ácido hialurônico^{2,7}. Esta enzima é um antídoto recomendado pela *Oncology Nursing Society* (ONS) que orienta a aplicação de forma subcutânea 1,0 ml de 150UI/ml na área de extravasamento⁸. No máximo em dez minutos após a aplicação, já é possível observar a ação da enzima, pelo aumento da difusão do líquido extravasado em uma área 3 a 5 vezes

maior do que uma área não tratada. A permeabilidade do tecido é restaurada de 24 a 48 horas após a aplicação do antídoto^{3,8,29}.

É um importante agente enzimático usado para aumentar a absorção e dispersão de outras drogas de extravasamento. Também tem sido usado como coadjuvante no tratamento de extravasamento de agentes quimioterápicos. Também é utilizada em extravasamentos de vários medicamentos, principalmente soluções hiperosmolares. Não há contra indicação, podendo ser realizada em crianças e adultos, também sendo aprovada pelo FDA³⁰.

4.4 Fotobiomodulação

O uso da laserterapia ou FBM foi reportado pela primeira vez pelo cientista Húngaro Endre Mester na Universidade Semmelweis, em Budapeste, Hungria entre 1966 e 1967 logo após a descoberta do laser de rubi (1960) e o laser de hélio-néon (HeNe; 1961). Em sua pesquisa, observou que a aplicação de luz laser, na região dorsal de camundongos tricotomizados, poderia induzir o crescimento do pêlo raspado mais rapidamente do que em camundongos não tricotomizados. Aplicou suas descobertas com laser em pacientes com úlceras cutâneas que não cicatrizavam observando a cicatrização completa das lesões³¹.

A FBM tem sido muito utilizada para acelerar o processo cicatricial de diversos tipos de lesões, promovendo melhorias na qualidade de vida dos pacientes e acelerando os tratamentos^{5,31}.

A FBM é nomeada de acordo com o comprimento de onda em vermelho visível (622-780nm) e infravermelho (780 a 1.500nm) e consiste em uma fonte de irradiação não ionizante de células com um comprimento de onda adequado, o qual pode levar a ativação de componentes celulares e promover reações químicas específicas, responsáveis por alterar o metabolismo celular³².

Estes processos biológicos de interação tecidual podem manifestar-se em quatro

efeitos sequenciais: primários, secundários, terciários e quaternários. Os primários estão relacionados com a primeira ação direta na célula, por meio dos fotorreceptores^{33,34}. Para que isto aconteça é necessário que a luz seja absorvida, e os responsáveis por esta absorção são os denominados cromóforos ou fotorreceptores, que consistem num grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas celulares, ou quaisquer outras substâncias extracelulares que apresentem a capacidade de absorver luz num determinado comprimento de onda, mesmo não especializadas para isto^{35,36}. Os principais cromóforos biológicos na faixa do vermelho visível são: citocromo C oxidase (CCO), hemoglobina, lipídeos, melanina, proteínas estruturais; e do infravermelho água e suas moléculas, flavoproteínas, citocromos e canais de íons. O cromóforo primário a receber a luz vermelha é o CCO, localizado na unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na atividade de várias moléculas, principalmente de óxido nítrico (NO), ATP e espécies reativas de oxigênio (ROS)³⁴. Sequencialmente, inicia-se um processo secundário no qual, as mitocôndrias produzem NO que se ligam aos CCO e desloca o oxigênio, inibindo a respiração celular e consequentemente diminui a produção de ATP, do metabolismo, causando um aumento do estresse oxidativo. A absorção do CCO principalmente pelo comprimento de onda vermelho leva a um fotodesligamento do NO, ativando a enzima levando a um gradiente de prótons, resultando em uma redução do estresse oxidativo e como consequência temos um aumento na produção de ROS, ATP e íons de Ca^{2+} , aumentando a diferenciação, proliferação e migração celular^{34,37}.

Os efeitos terciários estão relacionados as vias de sinalização REDOX, que descrevem o processo regulatório para induzir respostas que possam prevenir danos oxidativos, além de restabelecer a “homeostase redox”. A FBM principalmente com a luz vermelha, transforma a primeira molécula da espécie reativa de oxigênio (ERO) produzida nas mitocôndrias de O_2 em H_2O_2 ; portanto, dependendo da rede de sinais em que atuar a célula poderá mudar sua taxa de proliferação, morrer ou suprimir a produção excessiva de EROs, devido ao estresse oxidativo a

curto prazo, resultando no efeito antioxidante³⁸. Os radicais livres são produtos do metabolismo celular normal sendo considerada uma molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados, o que o torna instável, altamente reativo e com vida curta. Por ser muito reativo, ele atrai o elétron de outras células para adquirir estabilidade. Com isso, a célula atacada perde seu elétron e passa ser um radical livre, gerando um efeito em cascata que danifica a célula. As ROS em níveis moderados são consideradas compostos benéficos para o organismo, atuando em várias funções como na sinalização celular e alteração da transcrição gênica com a ativação do fator Kappa B (NF-kB), resultando na expressão de genes estimuladores de fatores de crescimento de fibroblastos, citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas no processo e reparo tecidual. A resposta mitogênica, a regulação redox a função imunológica, também são desencadeadas quando há um equilíbrio da ROS. Porém, quando há uma produção em excesso de ROS (uma inflamação por exemplo), ocorre um aumento do estresse oxidativo que pode danificar várias moléculas como lipídeos, proteínas e o DNA^{37,39}.

Durante esse processo ocorre a excitação dos elétrons que liberam ATP utilizado pelas células para o desenvolvimento de suas funções. Como consequência, ocorrem reações bioquímicas favorecendo a resposta biológica pretendida (anti-inflamatória, analgésica, cicatricial) permitindo a síntese de proteína e a proliferação celular⁵.

Podemos inferir que os efeitos quaternários estão relacionados as mudanças clínicas proporcionadas pela FBM, como por exemplo, a cicatrização de feridas.

Acredita-se que a ação do FBM sobre o tecido esteja relacionada com a inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, acelerando o processo de cicatrização, reduzindo a dor (analgesia) e o edema. Os benefícios estão relacionados a um aumento do infiltrado de leucócitos, da atividade dos macrófagos, da neovascularização e proliferação de fibroblastos e queratinócitos⁶.

A FBM tem influência nas diversas fases da cicatrização de feridas que incluem: a fase inflamatória, proliferativa e de remodelação. Os efeitos biológicos são dependentes da dose aplicada. Age preferencialmente na cadeia respiratória mitocondrial, predominantemente no cromóforo CCO onde facilita o transporte de elétrons e impulsiona a produção de ATP (fonte de energia de todas as células) aumentando as funções do metabolismo celular. Desempenham um importante papel em todas as fases, incluindo a indução da expressão de citocinas e fatores de crescimento que estão presentes nas três fases de cicatrização. Na fase inflamatória a FBM modula o processo inflamatório, por meio do aumento da síntese de proteínas e interleucinas em queratócitos, citocinas, iniciando o processo de reparação. Fatores de crescimento são acionados na fase proliferativa, iniciando-se a neovascularização e a proliferação de fibroblastos. A FBM faz com que os fibroblastos diferenciem-se em miofibroblastos, favorecendo a contração da ferida. Na última fase, promove a maturação do colágeno, promovendo uma tensão superficial adequada no tecido⁴⁰.

Efeitos bioestimuladores podem ser mediados pela FBM destacando-se: indução da atividade mitótica das células epiteliais e fibroblastos, incentivando a produção de colágeno, estimulando a microcirculação local e a inibição secretória de alguns mediadores químicos. Além disso, são responsáveis por um aumento na atividade de quimiotaxia e fagocitose dos leucócitos, tornando-os mais responsivos aos mediadores químicos, além de aumentar a atividade fagocitária durante a fase inflamatória do processo de reparo, facilitando a limpeza da ferida⁴¹.

A FBM acelera a cicatrização pois aumenta a viabilidade celular ao estimular a síntese de ATP. A eficácia dependerá dos parâmetros empregados, como fonte de luz, comprimento de onda, densidade de energia, e duração da aplicação³⁴.

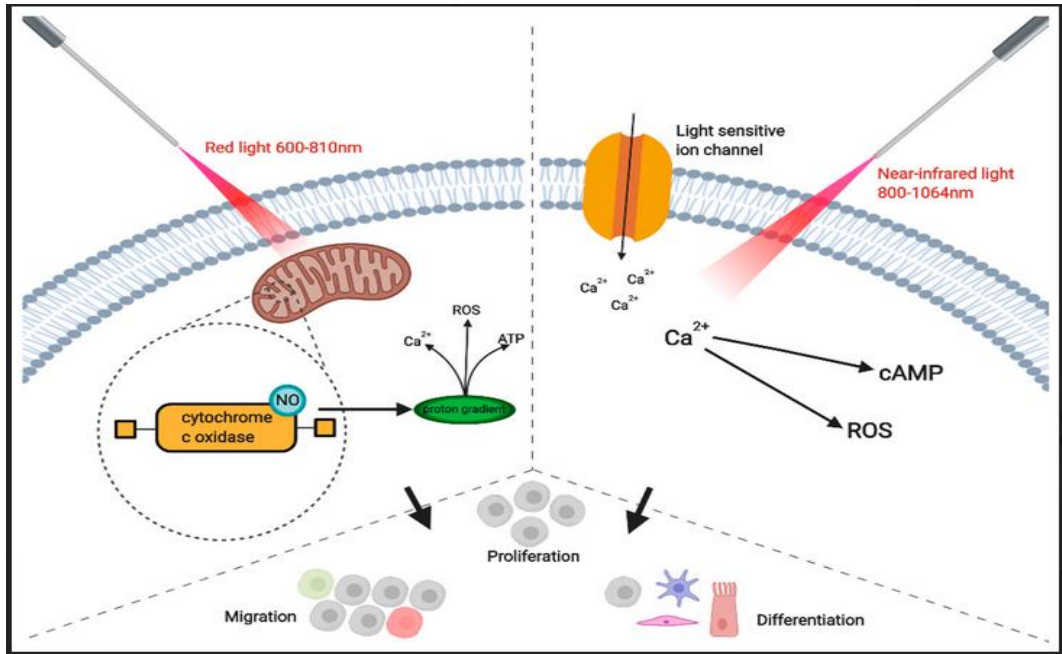


Figura 1. Aplicação da luz vermelha agindo diretamente sobre o citocromo C oxidase, deslocação do NO com consequente aumento de ATP, Ca²⁺, ROS, causando os efeitos no organismo³⁴.

A utilização do FBM na lesão promove tanto efeitos analgésicos como anti-inflamatórios. Em relação a analgesia, a radiação atua desde receptores periféricos até o sistema nervoso central, promovendo a liberação de endorfinas e, consequentemente, diminuindo a dor. Quando a ação esperada é anti-inflamatória, ocorre a reabsorção de exsudatos, aumento da síntese de prostaglandinas, aceleração da microcirculação que reduz o edema e elimina o acúmulo de catabólito⁵.

Para a aplicação do FBM, alguns parâmetros devem ser considerados como comprimento de onda, fluência, densidade de potência, estrutura de pulso e tempo da luz aplicada. A escolha de qual parâmetro utilizar vai depender da especificidade de cada tratamento, bem como do tipo de tecido que será irradiado. Portanto, uma escolha errada desses parâmetros pode significar em eficácia reduzida do tratamento, ou sem resposta terapêutica. O FBM é caracterizado por uma dose-resposta bifásica, onde doses mais baixas de luz são frequentemente mais benéficas que doses altas³¹.

Um efeito deletério foi comprovado por estudo realizado para investigar a ação da

FBM com comprimento de onda de 940 nm com diversas intensidades de energia na cicatrização óssea. Nesse estudo foram utilizadas as densidades de energia de 5, 10 e 20J com um tempo de irradiação de 10 segundos, porém com potências de 1,5 W, 3 W, e 6 W respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas, no processo cicatricial no que se refere a produção/ inibição de osteócitos, osteoclastos e osteoblastos estando relacionado a alta potência utilizada⁴².

A curva de Arndt-Achultz descreve os efeitos dependentes da doses de FBM empregadas e sugere que as células são melhores estimuladas quando submetidas as baixas doses de energia, enquanto estímulos moderados causam inibição da atividade celular e altas doses eliminação da atividade. Isso demonstra a importância da escolha da dosagem adequada³⁴.

5 MÉTODO

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo experimental modelo animal, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) instalada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP, com o protocolo 0026/2019.

Os animais delineamento experimental foram provenientes do Biotério de Criação localizado no Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBTEC). Logo depois, foram mantidos no Biotério de Experimentação, por um período de adaptação de 15 dias, e só depois foram serem submetidos ao experimento. O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Diagnóstico de Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu/SP. Durante todo o período foram controlados temperatura, nível de amônia, troca de cama, além de fornecimento de água e ração *ad libitum*. Foram examinados

cl clinicamente por um médico veterinário durante a admissão no laboratório e durante todo o experimento.

Foram tomadas medidas para garantir o enriquecimento ambiental, colocando-se rolos de papel nas gaiolas, na tentativa de diminuição do estresse causado pela manipulação.

5.1.1 Delineamento amostral

Foram utilizados 60 ratos fêmeas adultas da linhagem Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus Norvegicus*, com idade entre 3 a 4 meses. Após o período de adaptação de 15 dias, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos denominados de a) grupo controle (sem antídoto), b) grupo hialuronidase (H), c) grupo fotobiomodulação (FBM) e, d) grupo fotobiomodulação + hialuronidase (FBM+H).

Para realizar a randomização, após o período de adaptação, os animais foram identificados com número de 1 a 60 com caneta piloto na região dorsal. Quatro envelopes foram confeccionados e identificados com o tipo de tratamento, da seguinte forma:

Envelope 1: grupo controle (sem antídoto).

Envelope 2: grupo hialuronidase (H).

Envelope 3: grupo fotobiomodulação (FBM).

Envelope 4: grupo fotobiomodulação + hialuronidase (FBM+H).

Após, um membro da equipe do laboratório realizou um sorteio do número 1 ao 60. Os primeiros 15 animais sorteados fizeram parte do envelope 1 e assim sucessivamente. Cada grupo foi composto por 15 animais que ficaram acondicionados em gaiolas com 5 animais cada, retangulares de polipropileno, colocadas em estantes ventiladas ALESCO®, mantidos em temperatura ambiente, com movimentação livre. Importante salientar que após a inoculação da DOX, os animais foram separados, mantendo-se em gaiolas individuais.

As gaiolas eram identificadas com o número dos animais e com o grupo ao qual

pertenciam.

Considerando que existe uma ocorrência de 50% dos casos de necrose (controle) e supondo que a aplicação do tratamento reduza esse percentual para zero (sem necrose), o tamanho mínimo para a realização do experimento com uma margem de erro de 5%, compatibilidade de 95% e poder de 90%, será de 15 animais por grupo (60 animais para os 4 grupos).

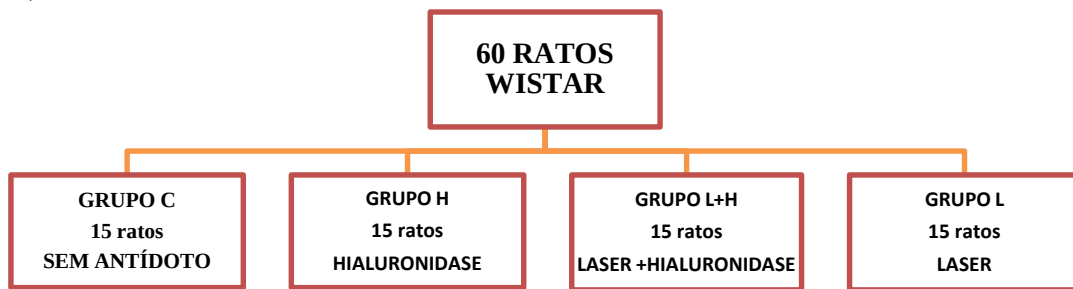


Figura 2. Organograma do desenho experimental

5.2 Procedimentos técnicos do experimento

5.2.1 Procedimento para preparo do antineoplásico

O antineoplásico que foi utilizado neste trabalho é a doxorrubicina (DOX), um agente quimioterápico da classe das antraciclinas, amplamente recomendado em diversos tipos de neoplasias. A DOX foi preparada por um farmacêutico habilitado do Ambulatório de Oncologia do Hospital Estadual Botucatu, seguindo todos os preceitos técnicos e legais para manipulação de antineoplásicos. Para tanto, foi preparada em Cabine de Segurança Biológica (CSB), Classe II B2, conforme preconizado pela RDC 220 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 21 de setembro de 2004⁴³. A CSB é indicada para a manipulação de produtos de alta toxicidade, pois promove total exaustão externa garantindo a segurança do manipulador⁴⁴.

O frasco ampola da DOX apresentava-se com 10 mg em 5 ml, perfazendo um

equivalente de 2mg/ml. Foi aspirado 0,5 ml da solução, contendo um total de 1 mg de DOX. Pesquisa realizada com extravasamento em ratos, comprovou que a injeção intradérmica de 1mg de DOX, foi capaz de causar lesão com necrose⁷.

Logo após, as amostras de DOX foram transportadas do ambulatório de oncologia para o laboratório experimental em caixa térmica de uso exclusivo, compostas por termômetro e identificação de risco químico, conforme RDC 220⁴³.

5.2.2 Procedimento anestésico

Os animais de cada grupo foram submetidos a anestesia geral inalatória, com auxílio de uma máscara facial, utilizando-se o gás isoflurano como agente anestésico. Após o início da anestesia, os animais foram pesados e colocados em decúbito ventral. Logo após, foi realizado uma tricotomia ampla da região dorsal desde as escápulas até o final das costelas, com auxílio de um tricotomizador elétrico. A área tricotomizada foi padronizada para todos os grupos (Figura 3).



Figura 3. Rato Wistar, decúbito ventral. Após anestesia, realizado tricotomia ampla do dorso da borda escapular até a base da cauda. Demarcação em cauda referente ao animal número 1 da caixa.

5.2.3 Procedimento de extravasamento do antineoplásico - DOX

Para indução do extravasamento o pesquisador paramentou-se com os EPIs necessários para administração de antineoplásicos, como avental descartável de manga longa, máscara PFF2 de carvão valvulada, luvas de procedimento e óculos de proteção individual, conforme preconizado pela Norma Regulamentadora nº 32⁴⁵. O laboratório foi equipado com maleta de derramamento de quimioterapia, para ser usada em escape acidental da DOX no ambiente.

Em cada animal de cada grupo foi realizada a antissepsia do local com álcool 70 INPM e, em seguida, administrada dose única de 1,0 mg de DOX (0,5 ml) em tecido subcutâneo localizado entre a escápulas e o final das costelas, utilizando uma seringa graduada de 1 ml e agulha hipodérmica 13 G x 4,5 mm (Figura 4).

Os animais foram inoculados com a DOX em dias separados: o grupo controle e o grupo FBM + H foram inoculados no dia 19/08/2019 e os grupos controle e FBM no dia 20/08/2019.



Figura 4. Rato Wistar, decúbito ventral, aplicação de 1,0 mg de DOX (0,5 ml) em tecido subcutâneo localizado entre a escápulas e o final das costelas, utilizando uma seringa graduada de 1 ml e agulha hipodérmica 13 G x 4,5 mm.

5.2.4 Procedimentos terapêuticos: aplicação dos antídotos

Após a aplicação da DOX, seguiu-se a aplicação de antídotos conforme a separação dos grupos:

- ✓ Grupo controle (sem antídoto): não foi aplicado antídoto;
- ✓ Grupo hialuronidase (H): foi aplicado o antídoto hialuronidase tópica (65 UTR) após 15 minutos da inoculação. Após, foi aplicada diariamente, em forma de pomada em todo o dorso no animal, mesmo na presença de lesão.
- ✓ Grupo FBM: Foi aplicado FBM 100 mW, vermelho 1 joule, comprimento de onda de 660 nm no ponto de inoculação, 10 minutos após. Nos dias subsequentes nos animais que não apresentavam lesão, a FBM ainda foi realizada no ponto de inoculação. Aos surgirem lesões, preconizou-se que em feridas até 1 cm de área, irradiava-se o centro da lesão, feridas até 2 cm de área, irradiava-se a norte, sul, leste e oeste e as que apresentassem mais que 2 cm de área, mais pontos foram realizados.
- ✓ Grupo FBM+H: foi realizada a FBM, conforme relatado no Grupo FBM e imediatamente após o laser foi aplicado o antídoto hialuronidase, conforme descrito no Grupo H.

Foi utilizado um equipamento a base de lasers de diodo semicondutor, em forma de caneta (Therapy EC, DMC group, São Carlos, SP, Brasil) que emite dois comprimentos de onda: um diodo laser no 660 nm (vermelho) e um diodo laser 808 nm (infravermelho). A potência pico de emissão foi de 100 mW, entregando de modo contínuo.

Foi utilizado em cada aplicação o espaçador na ponta do aparelho, bem como um filme de PVC para evitar a contaminação cruzada e desgaste do aparelho. Ao utilizar o filme de PVC, há uma perda em torno de 10% da luz emitida, porém não compromete o efeito clínico.

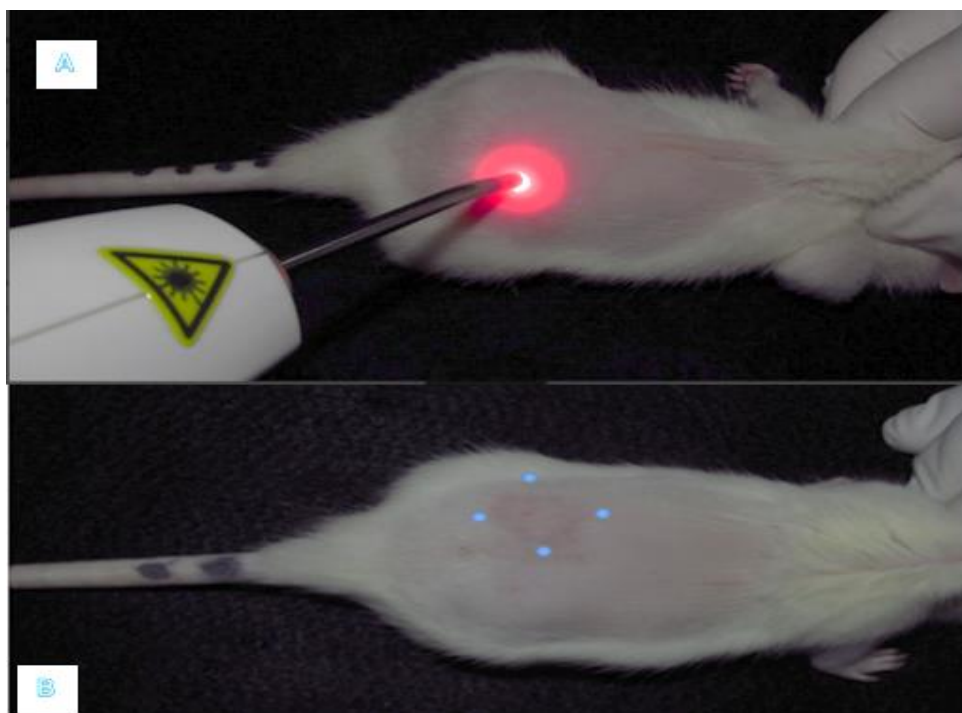


Figura 5. Rato Wistar, decúbito ventral. Observa-se a aplicação do FBM em ponto de inoculação da DOX localizado à direita entre a escápulas e o final das costelas (A) e esquema de aplicação do FBM em feridas até 2 cm de área, irradiando-se a norte, sul, leste e oeste (B).

5.2.5 Avaliação macroscópica

Todos os animais foram avaliados pela pesquisadora em relação a formação de flictema e de crostas, presença de necrose, edema, hiperemia, exsudato e sangramento com o intuito de acompanhar o aumento da necrose tecidual provocada pelo processo de extravasamento do DOX. As informações foram anotadas em uma ficha avaliativa (Anexo 1), adaptada do modelo utilizado por Valente (2014)⁴⁶ a cada dois dias, durante 30 dias, totalizando 14 avaliações. A avaliação do local da inoculação iniciou-se 48 após o procedimento, visto que os animais não apresentaram edema ou lesões que pudessem ser mensurados nesse momento. Concomitantemente, foram confeccionados um banco de registros fotográficos, (câmera digital CANON Power Shot SX170IS com velocidade 1/250 e distância de 0,7), para auxiliar na interpretação da evolução das feridas. O ângulo da foto e distância foram calculados por fotógrafa profissional da Faculdade de Medicina de Botucatu, a fim de padronizar as imagens.

5.2.6 Avaliação morfométrica

Para acompanhar o processo de formação das feridas, dois dias após o extravasamento, a área correspondente a lesão foi mensurada com auxílio de um paquímetro digital. As medidas foram tomadas a cada dois dias, durante vinte e oito dias, em duas direções da ferida, no maior comprimento (c = crânio-caudal) e na maior largura (L = látero-lateral), expressas em milímetros e posteriormente convertidas em centímetros (Figura 6).

A partir desses dados foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação ($A = C \times L$). A área de contração da ferida, foi calculada subtraindo-se a área inicial (A_0) da área final (A_f) ($A_0 - A_f$). O Percentual de Contração da Ferida (PCF) foi calculado subtraindo-se a área inicial (A_0) determinada no dia em que apareceu a lesão, da medida da contração da ferida (A_c), de forma que $PCF = A_0 - A_c / A_0 \times 100^{47}$.

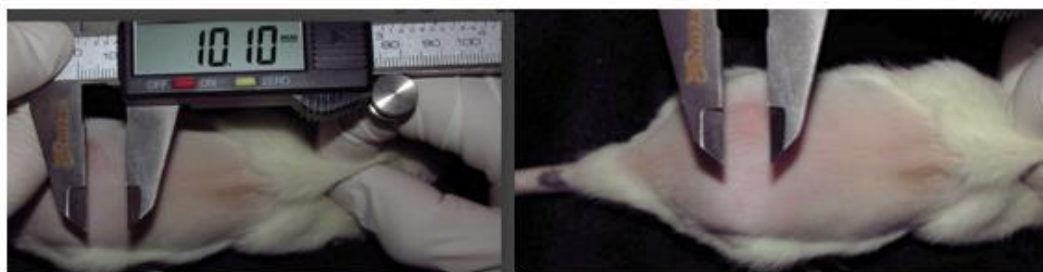


Figura 6. Mensuração com paquímetro digital da área de lesão de pele realizada em duas direções: no maior comprimento (c = crânio-caudal) e na maior largura (L = látero-lateral), expressas em milímetros e posteriormente convertidas em centímetros.

5.2.7 Avaliação histológica

Após o preparo das lâminas, as mesmas foram analisadas por profissional qualificado que desconhecia qual grupo pertencia cada amostra em análise.

A leitura das amostras coradas pelo HE, foram capturadas com o microscópio óptico Carl Zeiss, LAb A1, Germany, nas objetivas 10X e 40X, utilizando o software AxioVision 4.8, acoplado a uma câmara digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha).

As variáveis estudadas na análise histológica, foram: epitélio ulcerado, epitélio normal, necrose, crosta, abscesso, regeneração, inflamação aguda ou crônica, intensidade da inflamação e regeneração.

Na coloração de HE foram avaliadas a intensidade da reação inflamatória, sendo classificadas como leve, moderada ou intensa.

5.2.8 Procedimento de eutanásia/Obtenção da amostra

Decorrido o período pré-estabelecido (30 dias) os animais foram submetidos a eutanásia com sobredose de Tiopental Sódico, 150mg/Kg, intraperitoneal, conforme as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA⁴⁸.

Em seguida procedeu-se a remoção da área total da ferida, incluindo 2mm além da interface da borda da ferida ou da cicatriz. Os animais que não apresentavam feridas, a amostra foi coletada do local de inoculação da droga. Foram coletas fixadas em formalina tamponada a 10% durante 72h, logo depois lavadas em água corrente e submetidas ao álcool a 70% e mantidas até o processamento convencional de Hematoxilina & Eosina no Laboratório de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

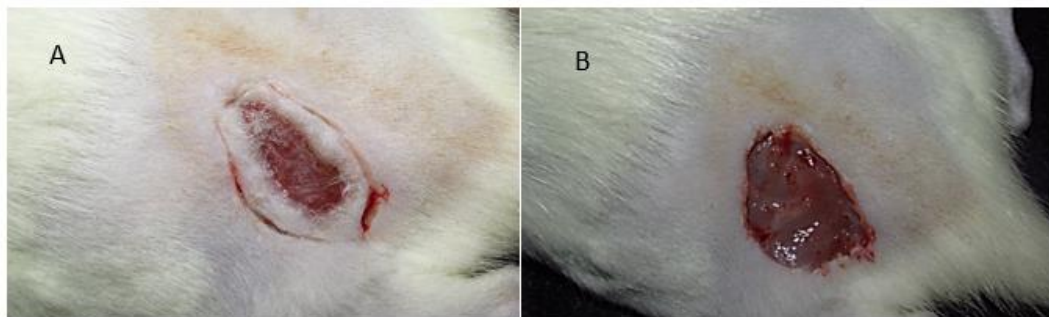


Figura 7. Rato Wistar, decúbito ventral. Observa-se a demarcação da área de remoção da ferida, incluindo 2mm além da interface da borda (A). Área de remoção da ferida evidenciando tecido muscular.



Figura 8. Rato Wistar, decúbito ventral. Observa-se a demarcação da área da inoculação da DOX em animais que não apresentaram lesão.

5.3 Análise de dados

Após tabulação dos dados foi realizada análise descritiva completa estratificada por grupos.

Houve uma comparação entre grupos de medidas quantitativas utilizando-se o método ANOVA seguindo do teste de comparação múltipla de Tukey, para identificar quais comparações intergrupos apresentam diferenças estatísticas.

Para análise dos dados resultantes das avaliações microscópicas relacionadas a histologia, será utilizado o Teste qui – quadrado ou Exato de Fisher, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

O estudo iniciou-se com 60 animais, porém, 23 animais morreram precocemente, finalizando o estudo com 37 animais. Acreditamos que a perda pode estar relacionada a diversos fatores como: toxicidade gerada pela antraciclina, pela hialuronidase e a fatores relacionados ao comportamento animal.

Os grupos que mais perderam animais foram os que utilizaram a hialuronidase (H:

09/15:60% e FBM+H: 8/15: 53,3%). Apesar dos grupos serem avaliados a cada 2 dias, a hialuronidase era administrada diariamente, podendo esse procedimento ser considerado estressante devido a intensa manipulação do animal. Com o intuito de promover o enriquecimento ambiental e garantir a diminuição do estresse gerado pela manipulação, foram colocados rolos de papel na gaiola, para distração do animal. Porém, mesmo com essa prática, observou-se que os animais lambiam a pomada demasiadamente, ingerindo a mesma.

6.1. Avaliação macroscópica

Já no D2 da inoculação, observou-se que os animais ainda não apresentavam necrose, porém alguns já demonstravam uma hiperemia bem delimitada. Apesar da inoculação ter sido realizada no lado direito do animal, as hiperemias estavam localizadas na área central e na lateral esquerda.

No D4 observou-se uma mudança de comportamento nos animais do grupo H e FBM+H, os mesmos não estavam se alimentando adequadamente e apresentaram diarreia. Porém, após avaliação do veterinário não apresentavam alteração do estado clínico, não sendo evidenciados sinais de dor e desconforto, não necessitando de intervenções.

No dia seguinte, observamos que os animais do grupo H estavam emagrecidos. Um animal apresentava enterorragia e morreu em seguida.

Nos animais do grupo FBM+H também foi observado um emagrecimento, porém estavam bem ativos, sem sinais de dor.

Diarréia intensa foi observada nos animais dos grupos H e FBM+H no D6. Os animais do grupo C e FBM iniciaram a diarreia de uma forma mais leve, havendo uma melhora significativa no D7.

Nos animais do grupo FBM e FBM+H, observou-se um crescimento de pelos no local da aplicação no sexto dia após a inoculação, sendo necessário nova tricotomia local.



Figura 9. Animal 4 do grupo FBM caixa 3. Observa-se a crescimento de pelos no local de inoculação da DOX e em todo o dorso.

No décimo dia de avaliação observou-se que dois animais do grupo H apresentavam diferença no comportamento, com presença de piloereção, postura curvada e cromodacriorreia (causada por uma secreção de pigmento vermelho (porfirina) nos olhos e no nariz), sinais e sintomas de farmacodermia, além de sangramento nas patas causado por lambedura intensa. Esse tipo de condição indica estresse e sofrimento do animal, sendo necessário a eutanásia precoce.

No D12 observou-se um animal do grupo hialuronidase com sangramento em patas por lambedura intensa, curvado, com piloereção, evoluindo a óbito logo após a avaliação.

Nesse dia, também foi observado que 2 animais do grupo FBM+H estavam em processo de cicatrização da ferida, apresentando epitélio quase refeito em toda a extensão da lesão.

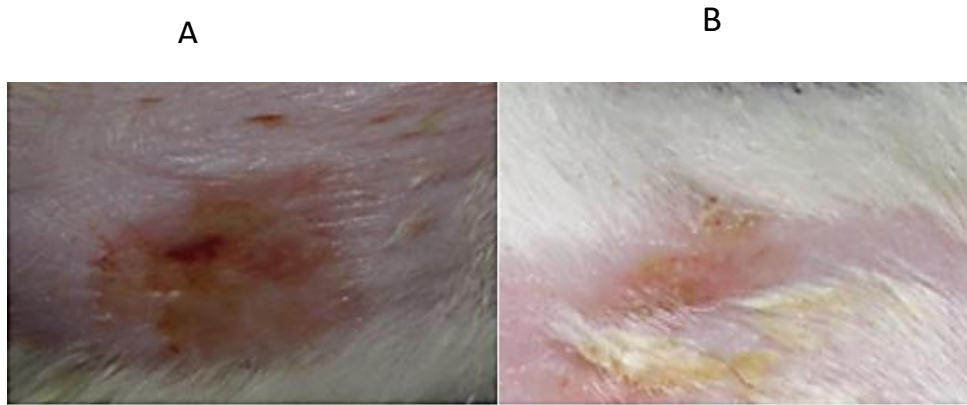


Figura 10. Animal 3 do grupo FBM+H caixa 3 (A) e animal 0 do grupo FBM+H caixa 3 (B). Feridas em processo de cicatrização. Observa-se a formação de epitélio.

Não foram observados flictemas nos animais. Durante a avaliação, algumas características foram mais frequentes em determinados grupos.

Levando-se em consideração a formação de lesões decorrentes ao extravasamento, observou-se que as alterações de pele e início do processo de feridas iniciou-se no D4, ficando mais evidente no grupo C (7/15: 46%). O desenvolvimento máximo das feridas ocorreu no D8 porém, alguns animais do grupo FBM (4/15:26%) não desenvolveram lesão até o final do estudo.

Observou-se que após 28 dias de avaliação 2 animais do grupo FBM e FBM+H apresentaram cicatrização completa das lesões.

Ao final do estudo, 6 animais (40%) do grupo FBM e 2 animais (13%) do grupo FBM+H apresentavam pele íntegra. (Figura 11)

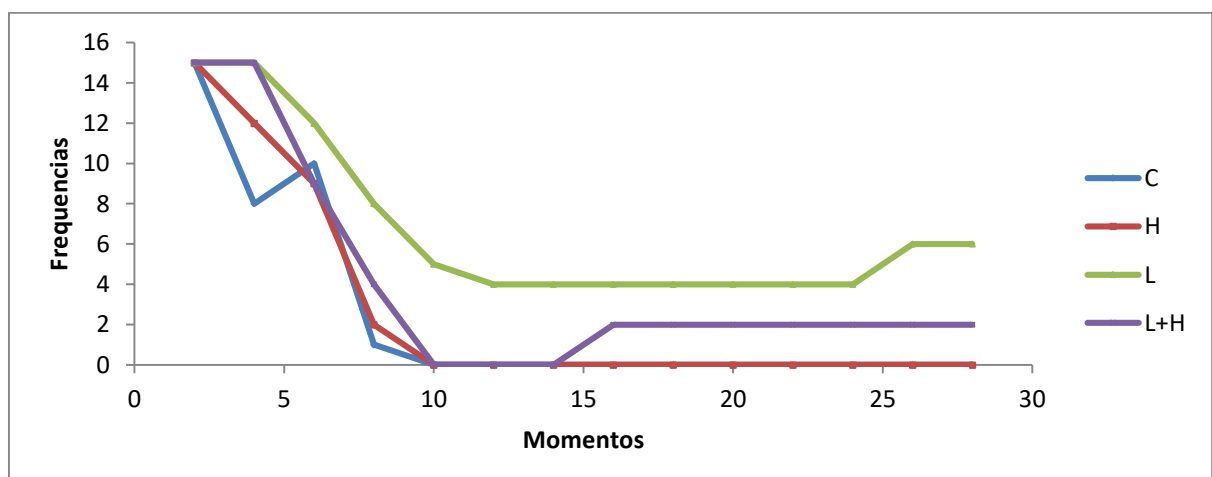


Figura 11. Demonstração gráfica da frequência relativa da formação de lesões ao longo da aplicação do tratamento nos quatro grupos. O eixo X representa os dias de avaliação e o eixo Y representa o número de animais. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação + hialuronidase.

A hiperemia foi observada logo no primeiro dia de avaliação (D2), sendo maior no grupo C e H, estendendo-se até o D16. Observou-se que nos grupos que utilizavam a FBM no tratamento, poucos animais apresentaram hiperemia, com pico máximo em D4 para ambos os grupos, em uma frequência menor de animais envolvidos, FBM (5/15: 33%) e FBM+H (9/15: 60%) onde FBM, mostrando significância estatística ($p=0,0001$).

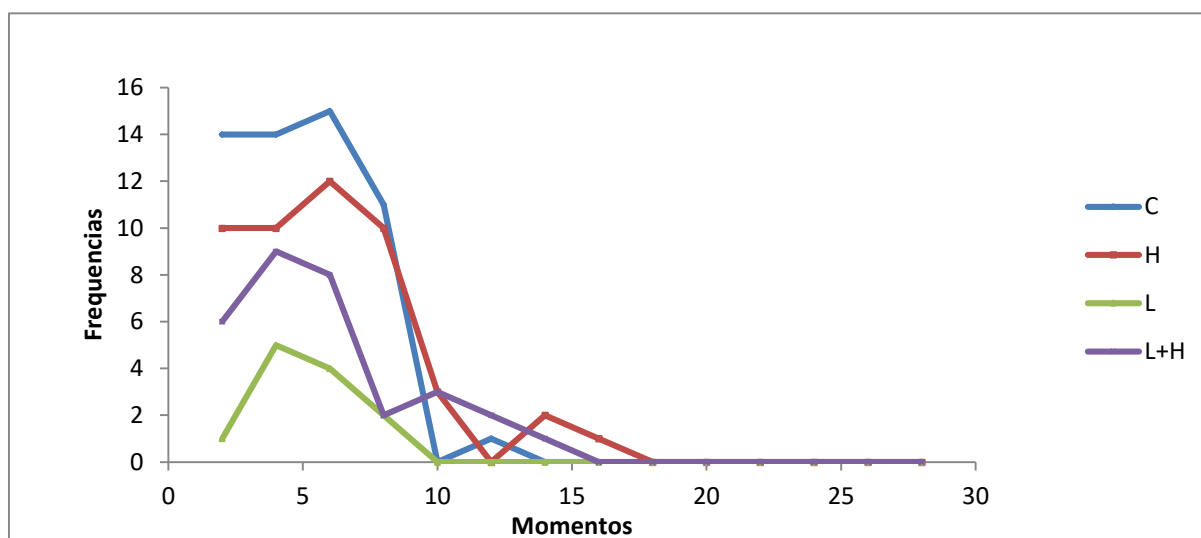


Figura 12. Demonstração gráfica da frequência relativa da presença de hiperemia ao longo da aplicação do tratamento nos quatro grupos. O eixo X representa os dias de avaliação e o eixo Y representa o número de animais. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação + hialuronidase.

O exsudato esteve presente em maior parte no grupo C (14/15: 93%) iniciando-se em D10, atingindo um número máximo de animais em D12 e estendendo-se até o final do experimento. Apresenta diferenças significativas quando comparado ao grupo L e FBM+H ($p<0.0001$).

Dos animais do grupo FBM, apenas um apresentou sangramento durante toda a pesquisa. Entretanto, nos animais dos grupos C, e H, evidenciou-se o sangramento já no terceiro dia de avaliação (D6), demonstrando uma significância estatística relevante ($p<0.0001$) entre os

grupos C (9/15= 60%), e FBM+H em dois momentos (D6 e D14), onde os animais do grupo FBM+H, não apresentavam sangramento.

A crosta foi observada durante toda a pesquisa em animais de todos os grupos. Porém, em menor quantidade de animais dos grupos H, FBM e FBM+H com diferença estatística significativa ($p<0,001\%$) onde o grupo C difere de FBM e FBM+H.

A Figura 13 demonstra que o tecido de granulação esteve mais presente em animais do grupo FBM e FBM+H já no D12. As lesões mostravam-se em processo de cicatrização.

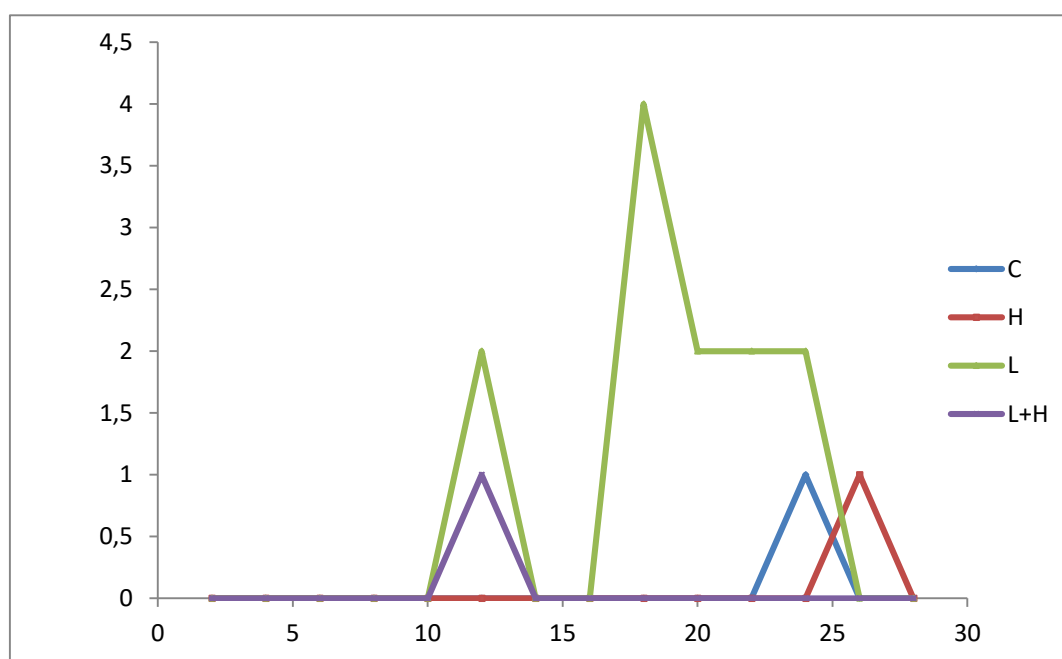


Figura 13. Demonstração gráfica da presença de tecido de granulação nos animais que apresentaram lesões referentes a inoculação de DOX em tecido subcutâneo, ao longo da aplicação do tratamento nos quatro grupos. O eixo X representa os dias de avaliação e o eixo Y representa o número de animais. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação + hialuronidase.

A tabela 1 e a figura 14, demonstram que os animais do grupo C apresentaram uma taxa de necrose maior em todos os momentos, iniciando-se já no quarto dia de avaliação (D4) e estendendo-se constante e progressivamente ao longo da pesquisa. Os animais dos grupos H, FBM e FBM+H também apresentaram necrose, porém em menor número e com melhora da lesão ao final do tratamento.

Tabela 1. Presença de necrose nos dias de tratamentos, nos diferentes grupos. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação + hialuronidase. Botucatu, 2020.

Grupos	Dias de tratamento													
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
C	0	1	0	7	9	9	9	11	10	10	12	12	12	12
H	0	0	1	3	6	5	5	5	4	5	6	6	5	5
L	0	0	2	1	2	1	1	3	4	4	4	3	3	3
FBM+H	0	0	0	2	2	4	5	5	5	4	5	4	4	4

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

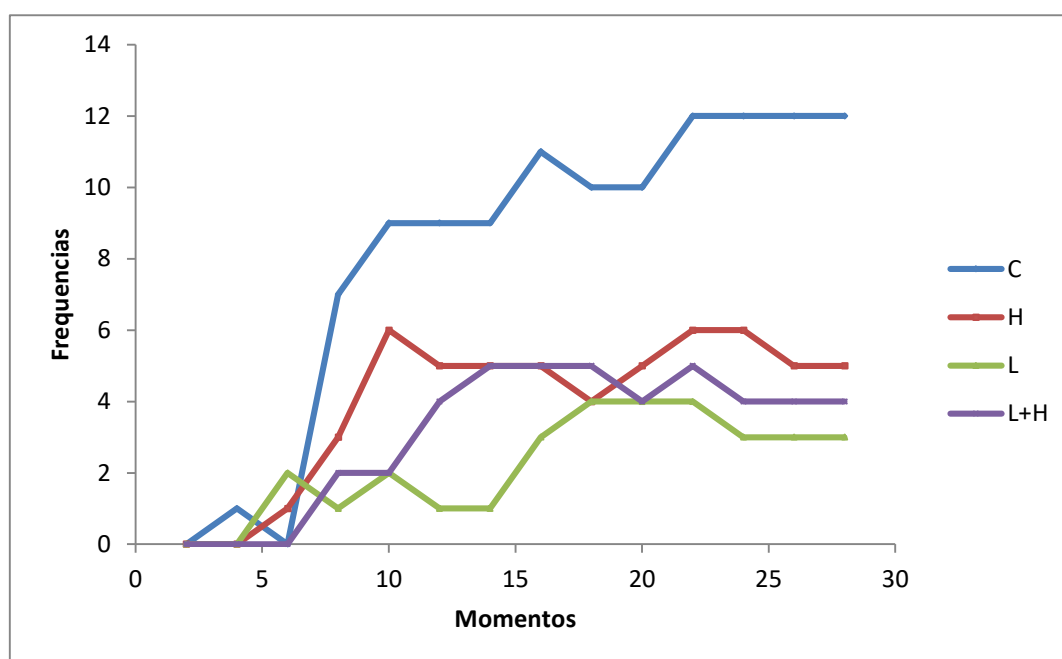


Figura 14. Demonstração gráfica da frequência relativa da presença de necrose em lesões ao longo da aplicação do tratamento nos quatro grupos. O eixo X representa os dias de avaliação e o eixo Y representa o número de animais. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação+ hialuronidase.

O edema foi observado em 14 (93%) dos animais do grupo controle já no primeiro dia de avaliação (D2). Uma pequena quantidade de animais do grupo FBM apresentaram edema (4/15=26%) apenas nos dias 20, 22 e 28, já o grupo FBM+H apresentou as melhores condições

nesse aspecto. Apenas 2 animais apresentaram edema nos dois primeiros dias de avaliação, sendo que apenas um animal continuou com edema até o D10.

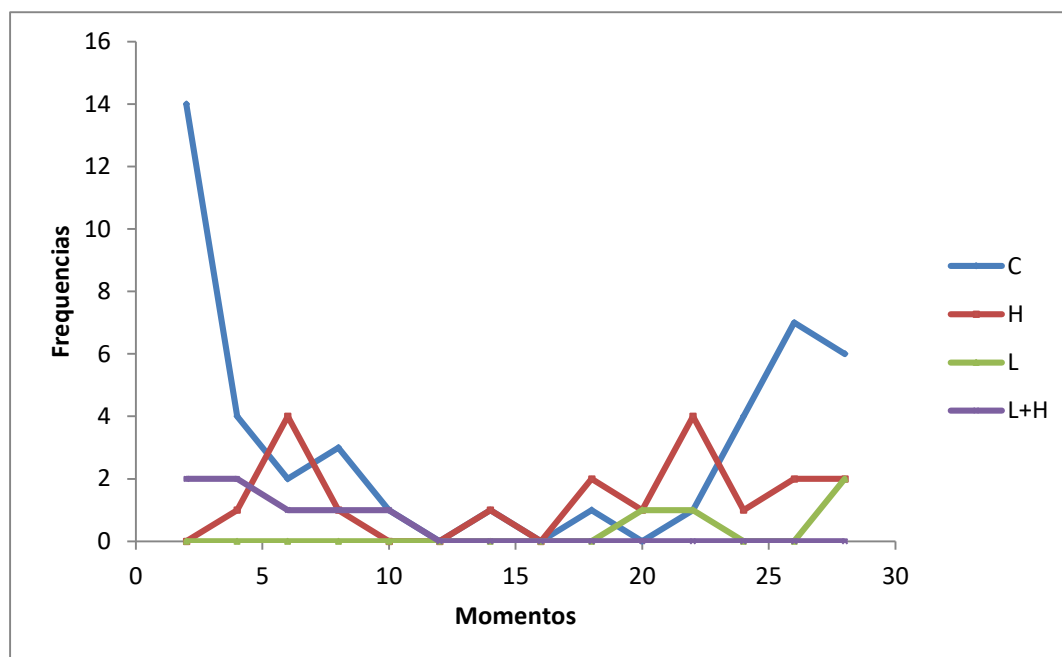


Figura 15. Demonstração gráfica da frequência relativa da presença de edema ao longo da aplicação do tratamento nos quatro grupos. O eixo X representa os dias de avaliação e o eixo Y representa o número de animais. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação+hialuronidase.

6.2 Avaliação morfométrica

6.2.1 Contração da ferida

Para verificar possíveis diferenças entre as médias da área de contração das lesões cutâneas nos diferentes tratamentos (controle, hialuronidase, laser + hialuronidase e laser) empregou-se a análise de variância unifatorial (ANOVA). Nesta análise cada valor de contração foi a variável dependente e os tratamentos a variável independente. Os pressupostos da ANOVA foram examinados pelos testes de Shapiro-Wilk (normalidade) e Levine (homogeneidade) e atendidos. Nos casos de diferenças significativas entre as médias foi aplicado o teste de Tukey para identificar quais tratamentos diferiram entre si. Estas análises foram computadas pelo programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2007).

Do total de animais que concluíram os tratamentos, 56,0% apresentaram contração das

feridas. Anova unifatorial aplicada sobre os valores médios da área de contração da lesão indicou diferenças significativas entre os tratamentos para esse atributo ($F= 33,08$; $p<0,001$) (Figura 13. O teste de Tukey revelou que o controle ($p=0,047539$) e o grupo FBM ($p=0,033896$) diferiram significativamente do FBM+H pelos menores valores médios registrados na área de contração da lesão cutânea. Cabe ressaltar que houve a contração total da ferida em indivíduos tratados com FBM (2 ratos) e FBM+H (2 ratos).

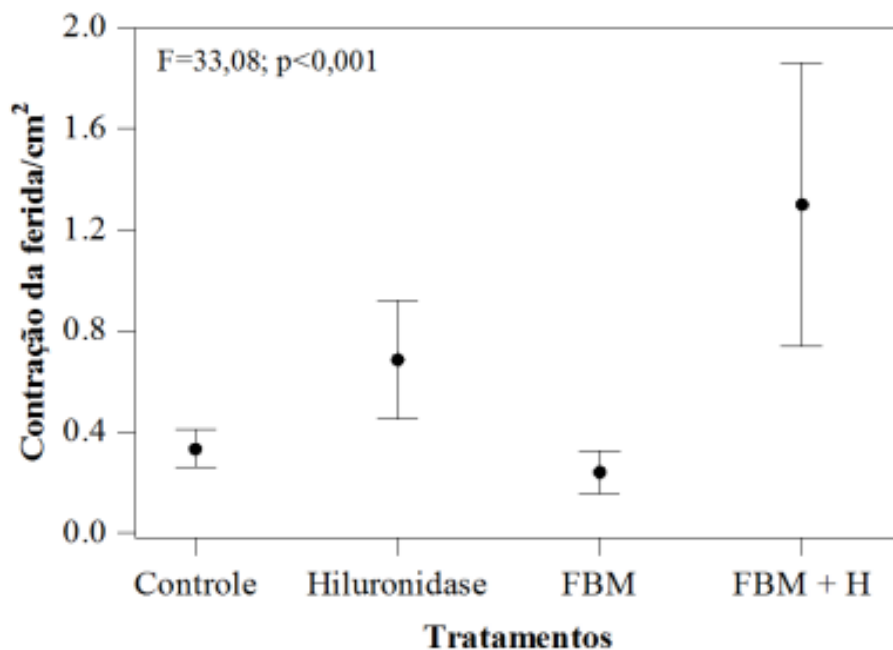


Figura 16. Valores médios da área de contração das feridas (cm²). Médias são representadas por círculos e erro padrão em barras. FBM+H = fotobiomodulação + Hialuronidase.

Considerando o PCF observa-se que houve um aumento gradativo no processo de cicatrização entre os tratamentos. Os maiores valores médios da taxa de contração das lesões cutâneas foram registrados para os animais tratados com laser e com FBM+H, representando percentual de cicatrização de 76,6% e 72,1% em relação a área inicial, respectivamente (Figura 17).

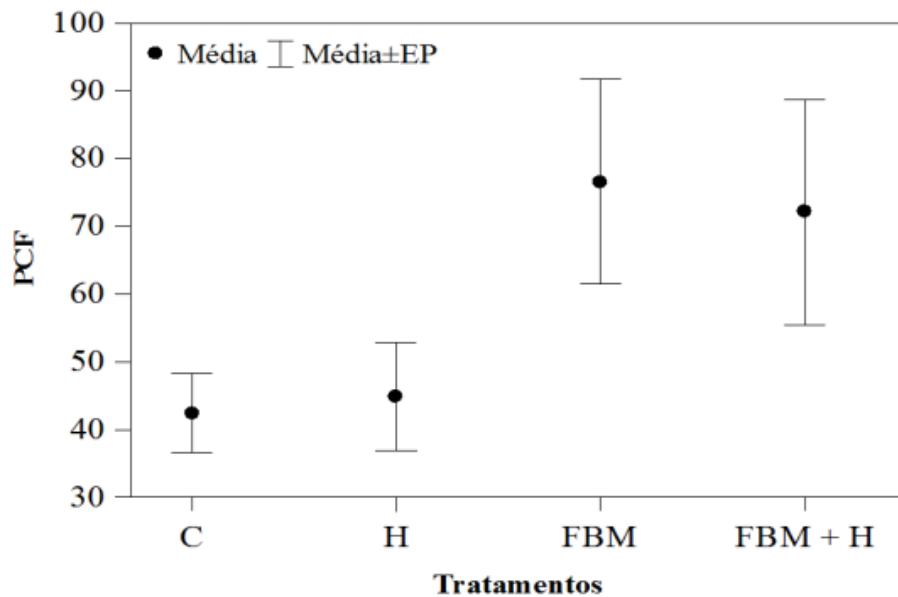


Figura 17. Percentual de Contração das Feridas registrada para os diferentes tratamentos de lesão cutânea. C = Controle, H = Hialuronidase, FBM= fotobiomodulação; FBM+H = Fotobiomodulação + Hialuronidase.

Ressalta-se que os valores médios das taxas de contração apresentam-se mais positivos quanto mais cicatrizadas estão as feridas, ou seja, quanto mais próximo do valor de 100, mais cicatrizada está a ferida.

6.2.2 Análise histológica

Os parâmetros avaliados histologicamente – epitélio (íntegro ou lesão), necrose, crosta, abscesso, regeneração, inflamação (aguda ou crônica) e intensidade da inflamação (leve, moderada, intensa), não apresentaram diferença estatística significativa no teste empregado (Exato de fisher) entre os grupos avaliados nas amostras coletadas no 30º dia. No entanto, foram listados os dados considerados importantes nesse estudo.

A presença da crosta foi mais observada no grupo FBM+H (3/7;42%) quando comparada ao grupo C (4/13; 30%) e ao grupo FBM (3/11; 37,7%). Não foi evidenciado epitélio com crosta nas amostras do grupo H.

De um modo geral, a intensidade inflamatória mais predominante foi a moderada mostrando-se em 40% (15/37) dos animais. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais ($p=0,6563$).

Os grupos FBM e FBM+H não apresentaram amostras com necrose, sendo esta mais evidenciada no grupo H (2/6; 33%) e C (3/13; 23%).

Quanto a regeneração do epitélio observou-se que foi mais presente no grupos com o antídoto hialuronidase, ficando FBM+H (4/7; 57%), H (3/6; 50%), demonstrando uma regeneração mais acentuada que nos grupos FBM (5/11; 45%) e grupo C (4/13; 30%), apesar da significância limítrofe ($p= 0,6803$).

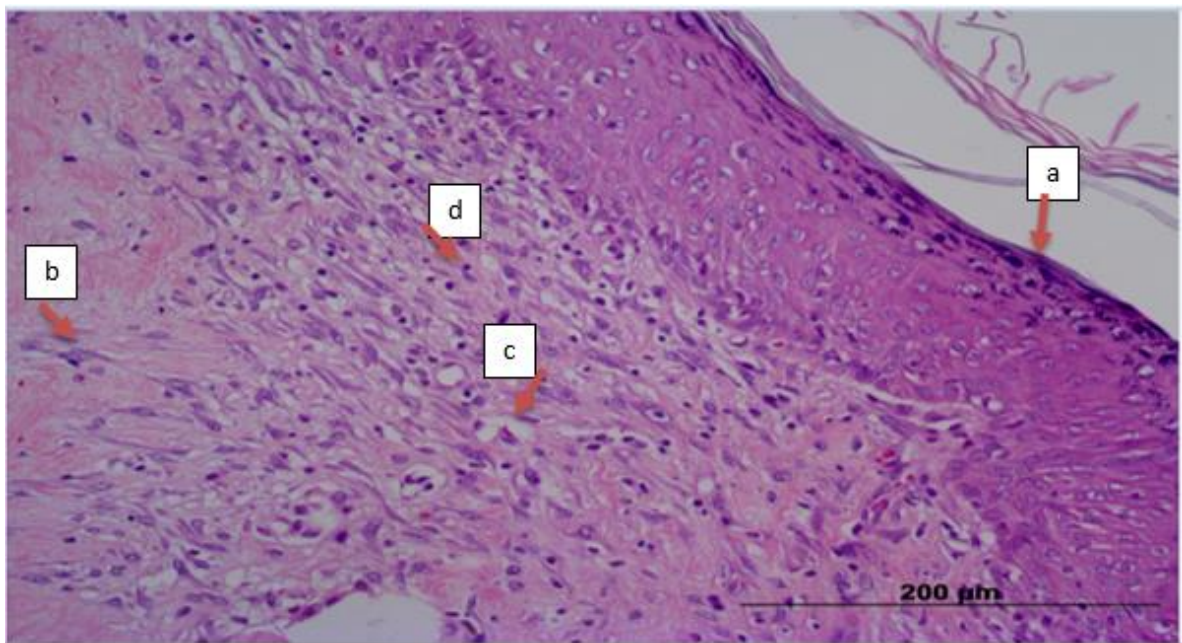


Figura 18. Grupo Controle, apenas foi induzida a lesão. Ao final do experimento no 30º dia, foi observado: a) camada epitelial regenerada (seta), b) derme superficial e profunda observar expressiva quantidade de fibroblastos jovens, neovascularização (c) e de perimeio infiltrado inflamatório mononuclear (d). HE.

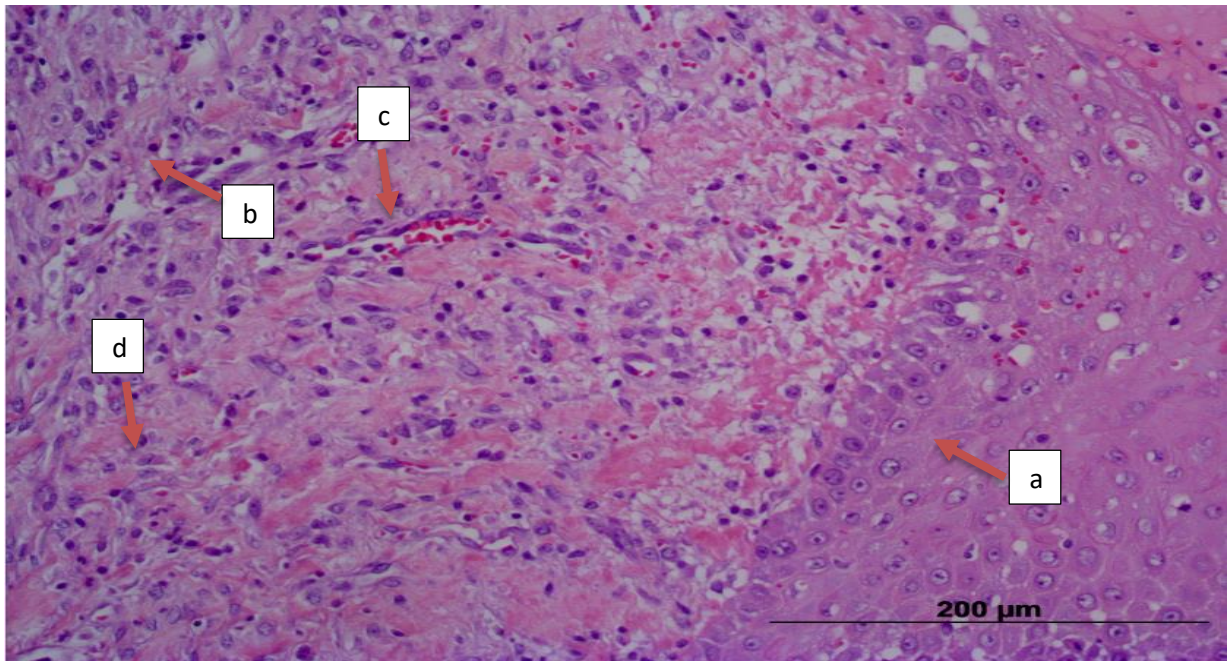


Figura 19. Grupo FBM+H, tratado com laserterapia + hialuronidase. Ao final do experimento no 30º dia, observou-se: segmento da camada epitelial se regenerando (a). Na camada da derme, tanto superficial quanto profunda infiltrado inflamatório expressivo (b). Presença de neoangiogênese com hemácias (c). Presença de fibroblastos (d) HE.

Evidenciou-se que amostras de dois animais do grupo FBM (2/11; 18%) não apresentaram qualquer alteração histológica, permanecendo com epitélio íntegro.

A Tabela 2 demonstra os principais dados encontrados nas amostras.

Tabela 2. Descrição microscópica dos grupos das amostras coletadas no 30º dia. C= controle, H= hialuronidase, FBM= fotobiomodulação, FBM+H= fotobiomodulação+ hialuronidase. Botucatu, 2020.

Descrição Microscópica	Grupos			
	C	H	L	FBM+H
Epitélio ulcerado, derme superficial a profunda com inflamação crônica tipo corpo estranho, com formação de células gigantes	1	0	0	0
Epitélio com abscesso que se estende até derme profunda	1	0	0	0
Epitélio com necrose de coagulação e inflamação aguda até derme profunda	2	0	0	0
Epitélio com necrose de coagulação e inflamação crônica com células gigantes	1	0	0	0
Epitélio com crosta de derme superficial à profunda, inflamação aguda e presença de neovascularização	2	0	0	0
Regeneração com neovascularização	2	0	5	4
Epitélio com crosta e abscesso com inflamação aguda	2	0	1	2
Epitélio de regeneração com neovascularização	1	0	0	0
Epitélio de regeneração com inflamação aguda e neovascularização	1	0	0	0
Epitélio com necrose de coagulação com inflamação aguda até a muscular	0	2	0	0
Epitélio com abscesso, inflamação crônica com células gigantes	0	2	1	0
Epitélio normal, sem lesão	0	0	2	0
Epitélio com abscesso com inflamação crônica e células gigantes	0	2	1	0
Epitélio com crosta e abscesso e derme com inflamação crônica com presença de células gigantes	0	0	1	0
Epitélio com crosta e derme com inflamação aguda	0	0	0	1
Total	13	6	11	7

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

7 DISCUSSÃO

O animal experimental utilizado neste estudo (*Rattus Norvegicus*) atendeu à expectativas e necessidades do nosso experimento. Por serem dóceis e de fácil adaptação permitiram um manuseio adequado.

Houve morte prematura de 23 animais, que pode estar relacionada a diversos fatores como: toxicidade gerada pela antraciclina, pela hialuronidase e ao comportamento animal. Em pesquisas experimentais, a vulnerabilidade é intrínseca à vida e os animais podem ser afetados

diretamente por circunstâncias desfavoráveis, comprometendo a qualidade de vida e o resultado da pesquisa⁴⁹.

A toxicidade gerada pela antraciclina corresponde aos sintomas observados nos animais como: diarreia e emagrecimento. A DOX não é um antineoplásico seletivo, portanto tem efeitos tóxicos principalmente nas células com rápida divisão celular. Um dos sistemas afetados é o gastrointestinal, produzindo efeitos colaterais como: náusea, vômito, diarreia e anorexia com consequente emagrecimento⁵⁰. Além desses efeitos, a inflamação aguda e o estresse oxidativo causadas pela DOX podem estar relacionadas à toxicidades em múltiplos órgãos⁵¹. Observamos que um animal do grupo controle, apresentou ascite ao final do estudo. Após a eutanásia e a coleta do material para a análise histológica foi realizada a autópsia, onde observou-se grande aderência no fígado, baço, coração e intestinos.

Nos animais que pertenciam aos grupos que continham hialuronidase, as lesões eram mais extensas o que pode estar relacionada a lambeduras observadas do início ao fim do experimento.

A hialuronidase é uma enzima e tem sua ação na degradação do ácido hialurônico que está presente na matriz extracelular, promovendo difusão do medicamento extravasado. É recomendada para extravasamentos de taxanos, alcaloides da vinca e etoposídeo. Comumente, utiliza-se injeções subcutâneas de 0,2 ml, com concentrações de 100 a 150UI. A quantidade de injeções deverá ser administrada conforme o tamanho da área da lesão²². Apesar de utilizarmos na nossa pesquisa apresentação tópica, não foi encontrado na literatura referências a essa via de aplicação em extravasamentos.

Em pesquisa realizada utilizando-se 36 ratos Wistar, que receberam injeção intradérmica de vincristina e diferentes antídotos (adrenomedulina, adrenomedulina + hialuronidase ou hialuronidase), observou-se que os animais pertencentes ao grupo da hialuronidase obtiveram uma melhor preservação da morfologia da pele, causando apenas

pequenas alterações, diminuindo significativamente o tamanho da úlcera, os sinais histológicos de lesão tecidual e a formação de edema⁵². Fato esse que corrobora com os resultados encontrados, no qual apenas 2 animais do grupo FBM+H apresentaram edema. A FBM também tem papel importante na prevenção ou diminuição de edema durante processos de reparo tecidual, afinal os benefícios relacionados a redução de edema, do estresse oxidativo e das citocinas pró-inflamatórias, já estão bem estabelecidos⁵³. Um aumento considerável no fluxo sanguíneo ocorre decorrente da ação vasodilatadora do NO, porém, ao mesmo tempo, ocorre um estímulo da drenagem linfática diminuindo o edema, por meio do controle das citocinas pró – inflamatórias⁵⁴.

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo em um Ambulatório de Oncologia de um Hospital Público do interior do Estado de São Paulo, com objetivo de analisar o efeito da FBM e da hialuronidase tópica os dados referentes a extravasamento e infiltração de antineoplásicos em um período de 21 meses. Foram relatados 8 extravasamentos (entre eles 01 de antraciclina) e 7 infiltrações. Todos foram acompanhados e receberam em média 2 sessões de FBM (1joule – 100mw) e a hialuronidase tópica (65UTR) 3 vezes ao dia, por 4 dias. Constatou-se que não houve formação de lesões mesmo no paciente que fez uso de antraciclina⁵⁵.

É importante dizer, que durante o extravasamento de DOX ocorre a formação do complexo DOX – DNA que é responsável pela morte celular desencadeando um processo sem controle com liberação de grande quantidade de radicais livres causando um estresse oxidativo acentuado, aumentando o processo inflamatório e causando necrose¹⁷. O estresse oxidativo gerado pela lesão tem relação direta com a migração, ativação e acúmulo de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) causando uma oxidação de lipídeos, da membrana celular e uma fragmentação do DNA, promovendo um desequilíbrio. A FBM age diretamente no estresse oxidativo. A luz vermelha é absorvida pelo CCO (presente nas mitocôndrias),

ocorrendo um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio levando a uma restauração do equilíbrio celular pela produção de enzimas antioxidantes⁵⁶.

Entretanto, o dexrazoxane é o único antídoto aprovado pelo Food and Drugs Administration (FDA) e pela Comissão Europeia para o extravasamento de DOX com uma eficácia de 98%. O mecanismo de ação é pela ligação da droga a molécula de ferro impedindo a formação de radicais livres¹⁸. Além de ser inviável para o setor público (pelo preço) pode causar efeitos colaterais náuseas, vômitos, dor discreta no local da infusão e aumentos reversíveis das enzimas hepáticas^{2,57}.

Hoje no Brasil, o frasco de 500 mg de dexrazoxane é vendido a partir de R\$ 1.200,00. A dose recomendada para uso é de 1.000mg/m² no 1º e 2º dias e 500mg/m² no 3º dia. O custo do tratamento dependerá da superfície corpórea (SC) do paciente. Para um paciente relativamente pequeno que possua uma SC de 1m², o tratamento fica em torno de R\$ 6 mil.

Em contrapartida, a FBM associada a hialuronidase apresenta um custo benefício mais acessível. O aparelho de laserterapia custa em média, no Brasil, R\$ 4.500,00 e um frasco de 30 gramas de hialuronidase em torno de R\$ 20 reais. Importante ressaltar que o aparelho de laserterapia tem um custo baixo de manutenção anual e pode ser utilizado diversas vezes para muitos pacientes, não onerando o serviço.

Este é primeiro trabalho que investigou a associação da FBM com a hialuronidase tópica no extravasamento de DOX. Porém, a eficácia da FBM já foi comprovada em outros tipos de lesões, podendo ainda ser associada a terapias tópicas.

A FBM é muito utilizada em feridas de diversas etiologias, entre elas as queimaduras. Em pesquisa realizada, foram avaliados 10 pacientes diabéticos com queimadura grau III. Realizou-se o transplante autólogo de fibroblastos associado a FBM apresentando resultados satisfatórios, considerado um método eficaz no tratamento de feridas dessa etiologia⁵⁸.

Cunha et al, 2019⁵⁹, avaliaram o uso de três protocolos no reparo de feridas excisionais

em 60 ratos, observando que a FBM proporcionou uma diminuição significativa na gravidade da resposta inflamatória, independente do protocolo. O protocolo de 4J apresentou as maiores taxas de deposição de colágeno, sugerindo que a aplicação diária induziu um efeito de estimulação mais intensa.

Análise histomorfométrica na cicatrização de feridas utilizando-se diversos comprimentos de onda (658, 830 e 904 nm), observou que o comprimento de onda de 658 nm foi mais efetivo quanto ao reparo tecidual^{60,61}. Nesse sentido, resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, demonstrando que a escolha do comprimento de onda foi a correta, pois observou-se uma melhora significativa na contração das feridas, presença de neovascularização, fibroblastos e processo inflamatório agudo.

Nesse estudo, os grupos que utilizavam a FBM apresentaram melhores taxas de contração e características histológicas importantes como: ausência de necrose, presença de neovascularização, reação inflamatória aguda. A associação da FBM com hialuronidase favoreceu a regeneração do epitélio comparado aos outros grupos.

Em um estudo de caso sobre o extravasamento de antraciclina (epirrubicina) em um acesso venoso central (cateter totalmente implantado) em hemitórax direito, observou-se que a paciente apresentou necrose em 2/3 da mama logo nos primeiros 10 dias, perdurando por 32 dias quando foi submetida a procedimento cirúrgico para ressecamento da necrose. Importante relatar, que não foi aplicado antídoto nessa paciente, pois já havia passado 24 horas do extravasamento. Um enxerto de pele foi colocado no local, e após 8 meses foi realizada a reconstrução mamária⁶². Resultado semelhante foi encontrado no nosso trabalho em relação o antídoto e formação de necrose. Os animais que não receberam antídoto, observou-se maior quantidade de necrose em todos os momentos avaliados, iniciando-se no quarto dia de avaliação e estendendo-se constante e progressivamente ao longo da pesquisa. Diferentemente do que foi encontrado com os animais dos grupos que utilizaram antídotos. Todos os grupos apresentaram

necrose, porém em menor quantidade e com melhora da lesão e desaparecimento da necrose no final do estudo.

Redução no tamanho das feridas foi observada em estudo realizado com oito pacientes portadores de lesão por pressão (LPP), diabéticos, que foram irradiados com laser vermelho (660nm), potência de 100mW e densidade de energia de 2J/cm². Além disso, foi observado aumento dos níveis de fatores de crescimento como VEGF e TGF- β , com um aumento de 50% no tecido de granulação⁶³. Outro estudo, utilizou diferentes protocolos de tratamento, com comprimentos de ondas distintas (658 nm, 808 nm e 940 nm). Observou-se que comprimento de onda de 658 nm foi mais eficaz. Acredita-se que esse feito esteja relacionado à inibição dos processos inflamatórios, à estimulação de angiogênese e proliferação de fibroblastos, conforme os achados da concentração de interleucinas, TNF- α e nas atividades de VEGF, TGF β 1 nas biópsias das feridas⁶⁴. Está cada vez mais claro que a FBM tem alcançado resultados promissores na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos, observando-se uma melhora na qualidade de vida por meio da diminuição da dor, melhora no reparo tecidual e diminuição do tamanho das feridas^{65,66}.

Constatamos no estudo que o tecido de granulação ficou mais evidente nos animais do grupo L, ocorrendo o início do seu aparecimento em D12, pico máximo em D18, com estabilização a partir do D20 com queda acentuada no D26, demonstrando a substituição do tecido de granulação pela epitelização gradual com consequente cicatrização das feridas de 2 animais do grupo L e 2 animais do grupo FBM+H. Acreditamos que os animais do grupo FBM+H não apresentaram resultados melhores em relação a granulação, pelo impacto que a lambertura constante causava na ferida.

A neoangiogênese foi mais evidente nos animais dos grupo que continham a FBM. A promoção da angiogênese é um fator importante na cicatrização de feridas, visto que pacientes em tratamento quimioterápico apresentam vasos sanguíneos mais vulneráveis e fragilizados

pela própria toxicidade do antineoplásico. A FBM pode ser utilizada para promover a angiogênese limitando o possível dano celular⁶⁷.

O aumento das taxas de colágeno e a substituição precoce das moléculas de colágeno tipo III por tipo I, proporciona maior resistência ao tecido reparado⁵⁹.

Alguns fatores podem interferir no processo cicatricial, entre eles, o tabagismo, o qual causa vasoconstrição e diminui a perfusão tecidual, altera a homeostase celular, induzindo um estado pró – inflamatório, o que interfere no processo cicatricial. A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente nos leucócitos e causa um desequilíbrio do sistema antioxidante favorecendo danos às células, sendo maior em fumantes. A FBM mostrou-se eficaz na diminuição da MPO quando aplicado à uma lesão de tendão calcâneo durante a fase inflamatória aguda, mostrando-se com potencial efeito terapêutico nesse tipo de lesão⁶⁸.

A FBM também pode ser utilizada para a prevenção de danos teciduais, principalmente em pacientes oncológicos. Seu uso já é rotineiro e de excelência na prevenção e diminuição da gravidade das mucosites orais (MO) em pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia de cabeça e pescoço, ou em regime de condicionamento para transplante de células-tronco hematopoéticas, sendo seu uso recomendado pelo Mucositis Study Group da Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC/ISOO)⁶⁶.

A prevenção do dano tissular foi observada em 26% dos animais pertencentes ao grupo L, pois os mesmos não desenvolveram lesão tecidual, mesmo a análise histológica mostrando uma reação inflamatória moderada.

A FBM se mostrou uma terapia eficaz em estudo experimental e o custo benefício associado ao tratamento do extravasamento de antineoplásicos é favorável. Esse estudo traz evidências para o uso da FBM associada a hialuronidase no extravasamento de DOX, fornecendo informações importante e relevantes para a formulação de protocolos por profissionais da área de oncologia. Apresenta relevância clínica suficiente para a possibilidade

de incorporação de novas tecnologias pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

8 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que a associação da FBM (660nm - 1J) com a hialuronidase tópica (65UTR) sobre a lesão do extravasamento de DOX, foi eficaz no processo de cicatrização da ferida e que a FBM isolada foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões.

Os animais tratados com a FBM apresentaram tecido de regeneração com neovascularização e inflamação aguda, com melhora na cicatrização das feridas, o que não ocorreu nos outros grupos. As taxas de contração foram melhores nos animais tratados com L e FBM+H, com percentual de cicatrização de 76,6% e 72,1%, respectivamente. A combinação da FBM (660 nm- 1joule) com a hialuronidase tópica (65 UTR) mostrou-se eficaz no processo de cicatrização de feridas por extravasamento de DOX, podendo ser incorporada à prática clínica.

O extravasamento de antraciclina ainda é considerado um dos eventos mais temidos em oncologia. Medidas de prevenção devem ser incorporadas a prática diária de administração de antineoplásicos e protocolos de atendimento imediatos devem ser criados e consolidados a fim de garantir a segurança do paciente e a qualidade do tratamento.

Consideramos como limitação nesse estudo, a perda de alguns animais dos grupos que utilizavam a hialuronidase, podendo ter ocorrido por toxicidade, diminuindo a amostra. Outro fator limitante é a literatura inexistente sobre a fotobiomodulação no extravasamento de antraciclina. Novos estudo devem ser realizados no sentido de ampliar a casuística.

Essa pesquisa pode ser considerada o marco inicial no uso da FBM no extravasamento de DOX, garantindo uma autonomia profissional ao enfermeiro na prevenção e tratamento desse evento adverso tão importante. Novas tecnologias devem ser incorporadas a fim de garantir uma melhor assistência ao paciente oncológico.

9 REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, [Internet] 2019. [Acesso em 15/03/2020]. <http://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
2. Melo JMA, Oliveira PP, Rodrigues AB, Souza RS, Fonseca DF, Gontijo TF et al. Bundle construction and assessment before antineoplastic extravasation: a methodological study. Acta paul. enferm. [Internet] 2020 [cited 2020 Nov 08]; 33:eAPE20190075. Available from: https://acta-ape.org/wp-content/uploads/articles_xml/1982-0194-ape-33-eAPE20190075/1982-0194-ape-33-eAPE20190075-en.pdf
3. Melo JMA, Oliveira PP, Souza RS, Fonseca DF, Gontijo TF, Rodrigues AB. Prevention and conduct against the Extravasation of antineoplastic chemotherapy: a scoping review. Rev. Bras. Enferm [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 08]; 73 (4): e20190008. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/reben/v73n4/0034-7167-reben-73-04-e20190008.pdf>
4. Boulanger J, Ducharme A, Dufour A, Fortier S, Almanric K; Comité de l'évolution de la pratique des soins pharmaceutiques (CEPSP); Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). Management of the extravasation of anti-neoplastic agents. Support Care Cancer. [Internet] 2015 [cited 2020 Nov 08];23(5):1459-71.Available from: file:///C:/Users/User/AppData/Local/Temp/Boulanger2015_Article_ManagementOfTheExtravasationOf.pdf
5. Gomes CF, Schapochnik A. The therapeutic use of low intensity laser (LLLT) in some diseases and its relation to the performance in speech therapy. Distúrb. comun.[Internet] 2017 [cited 2020 Nov 08]; 29 (3): 570-8. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-881883>

6. Chamusca FV, Reis SRA, Lemaire D, Medrado A P. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. R. Ci. Med. Biol. [Internet]2012 [cited 2020 Nov 20];11(1):70-78. Available from: <https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5705>

7. Kesik V, Kurt B, Tunc T, Karslioglu Y, Citak EC, Kismet E, Koseoglu V. Melatonin ameliorates doxorubicin-induced skin necrosis in rats. Ann Plast Surg. [Internet] 2010 [cited 2020 Feb 29];65 (2): 250-3. Available from: https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Fulltext/2010/08000/Melatonin_Ameliorates_Doxorubicin_induced_Skin.29.aspx?casa_token=Yp6UqoQ8ucEAAAAA:Bci7fwuxRx-9z1ykYuhXYx3JKFs9pW3RyLBcAT9pAjP0lgl_6HNveCevLmogP5cq_92Ru6rl_tuVwCLM3jZr4xQuC0l3GZg

8. Schulmeister L. Extravasation management: clinical update. Semin Oncol Nurs. [Internet] 2011 [cited 2020 Nov 20];27(1):82-90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21255716/>

9. Szwed DN, Santos VLP. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. Cad. da Esc. de Saúde. [Internet]. 2016. [cited 2020 Feb 29];1(15):7-17. Available from: <https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2450>

10. Oliveira IVP, Dias RVC. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. Acta Veterinaria Brasília. 2012;6(4):267-71. Available from: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2959>

11. Lima NEP, Gomes GM, Feitosa ANA, Bezerra ALD, Sousa MNA. Laserterapia de baixa intensidade no tratamento de feridas e a atuação da enfermagem. Rev. enferm. UFPI. [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 29];7(1):50-6. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/bde-3362>

12. Beheregaray WK, Gianotti GC, Oliveira F, Terraciano P, Bianchi S, Vidor S, et al. Células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas

cutâneas. Arq. bras. med. vet. zootec. [Internet] 2017[cited 2020 Feb 29];69(6):1591-600. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352017000601591

13. Martelli A, Andrade TAM, Santos GMT. Perspectivas na utilização de fitoterápicos na cicatrização tecidual: revisão sistemática. Arch Health Invest. [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 29];7(8):344-50. Available from: <https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/3047>

14. Medeiros AC, Dantas Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. J Surg Cl Res. [Internet] 2016[cited 2020 Feb 29];7(2):87-102. Available from: <https://periodicos.ufrn.br/jsr/article/view/11438>

15. Miura NO, Aung NY, Yamakwa M. Effect of cold and hot compress on neutrophilic migration to the site of doxorubicin extravasation. Int J Clin Exp Pathol [Internet] 2019; [cited 2020 Nov 08];12(4):1468-1477. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6947076/pdf/ijcep0012-1468.pdf>

16. Bartlett J J, Trivedi PC, Pulinilkunnil T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. Journal of Molecular and Celular Cardiology.V104, MAR 2017 [cited 2020 Feb 29];P 1-8. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Autophagic-dysregulation-in-doxorubicin-Bartlett-Trivedi/af0a2bdf186ae7d0d5ee910a6d7de130533e8644>

17. Kesik V et al. Ozone Ameliorates Doxorubicine – Induced Skin Necrosis – results from an animal model. The International Journal of Lowel Extremity Wounds. [Internet] 2016 [cited 2020 Feb 29];15 (3): 248-254. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1534734615597863?casa_token=QI6roAUEv2gAAAAA:87pwpY20U6nrFYyE0dkqj3jxhpxwYnbNuQhqwyinpDtVID_GanBIwcCTQBGi2kOpB48DRpA_MyBgUXw

18. Kolehini N, Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Oncotarget [Internet] 2017 [cited 2020 Nov 17]; 8(28):46663-46680. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5542301/pdf/oncotarget-08-46663.pdf>

19. Vidall C, Roe H, Dougherty L, Harrold K. Dexrazoxane: a management option for anthracycline extravasations. *Br J Nurs*. [Internet] 2013 [cited 2020 Nov 17];22(17):S6 -12. Available from: <https://europepmc.org/article/pmc/pmc4734939>

20. Thakur A, Thakur JS. Extravasational toxicity of anticancer chemotherapy and its management. *OA Case Reports* [Internet] 2013 [cited 2020 Nov 17];2(3):26. Available from: <http://www.oapublishinglondon.com/article/509>

21. Wengström Y, Margulies A. European Oncology Nursing Society extravasation guidelines. *Eur J Oncol Nurs*. [Internet] 2008 [cited 2020 Nov 17];12(4):357-61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18765210/>

22. Kreidieh FY, Moukadem HA, El Saghir NS. Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation. *World J Clin Oncol* [Internet] 2016 [cited 2020 Nov 17];7(1):87-97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734939/pdf/WJCO-7-87.pdf>

23. Roe H. Anthracycline extravasations: prevention and management. *Br J Nurs*. [Internet] 2011 [cited 2020 Nov 17];20(17 Suppl 16):S8-22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22067533/>

24. Perez Fidalgo JA, Garcia Fabregat L, Cervantes A, Margulies A, Vidall C, Roila F. Management of chemotherapy extravasation: ESMO--EONS clinical practice guidelines. *Eur J Oncol Nurs*. [Internet] 2012 [cited 2020 Nov 17];16(5):528-34. Available from: <https://www.esmo.org/guidelines/supportive-and-palliative-care/chemotherapy-extravasation>

25. Schulmeister L. Vesicant chemotherapy extravasation antidotes and treatments. *Clin J Oncol Nurs*. [Internet] 2009 [cited 2020 Nov 17];13(4):395-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19648094/>

26. Chanes DC, da Luz Goncalves Pedreira M, de Gutierrez MG. Antineoplastic agents extravasation from peripheral intravenous line in children: a simple strategy for a safer nursing care. *Eur J Oncol Nurs*. [Internet] 2012 [cited 2020 Nov 17];16(1):17-25. Available from:

<https://europepmc.org/article/med/21440502>

27. Gomes IP, Reis PED, Pereira JFL, Xavier TGM. Dexrazoxane um aliado da enfermagem no extravasamento de quimioterápicos: revisão integrativa. Online Braz J Nurs. [Internet] 2009 [cited 2020 Nov 17];8(2):12. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=587411&indexSearch=ID>

28. Schulmeister L. Totect™ for Treating Anthracycline Extravasation Clinical Journal of Oncology Nursing. [Internet] 2007 [cited 2020 Nov 17];11(3). Available from: <https://cjon.ons.org/cjon/11/3/totect%E2%84%A2-new-agent-treating-anthracycline-extravasation>

29. Doellman D, Hadaway L, Bowe-Geddes LA, Franklin M, LeDonne J, Papke-O'Donnell L, et al. Infiltration and extravasation: update on prevention and management. J Infus Nurs. [Internet] 2009 [cited 2020 Nov 17];32(4):203-11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19605999/>

30. Ya-Min Y, Qiao-Ling F, Ai-Qiu Li, Jia-Ling C, Fei-Fei D, Mei Gong M. Treatment of Cutaneous Injuries of Neonates Induced by Drug Extravasation with Hyaluronidase and Hirudoid. *Iran J Pediatr*. [Internet] 2014 [cited 2020 Nov 17]; Aug; 24(4): 352–358. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339556/>

31. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*. [Internet] 2012 [cited 2020 Nov 17]; February ; 40(2): 516–533. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288797/>

32. Lizarelli RFZ. Reabilitação biofotônica orofacial: fundamentos e protocolos clínicos. 2ª ed. São Carlos: Compacta; 2018. 400 p

33. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. [Internet] 1989 [cited 2020 Nov 17];56(5): 691-704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2651364/>

34. Dompe C, et al. Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. *J. Clin. Med.* [Internet] 2020 [cited 2020 Nov 17], 9(6), 1724. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503238/>

35. Pratavieira, S; Andrade, CT; Kurachi, C. Fotodiagnóstico. In Bagnato, VS. Fotodiagnóstico vs Terapia fotodinâmica dermatológica. São Carlos: Compacta Gráfica e editora, 2015. 263-277

36. Ataka I. Studies of Nd: YAG low power laser irradiation on stellate ganglion. In: Ataka I. *Laser in dentistry*. 1th ed. Amsterdam: Elsevier; 1989.

37. Zecha JAEM, et al. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*. [Internet] 2016 [cited 2020 Nov 17];24(6):2781-92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26984240/>

38. Albenzi BC., Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*. [Internet] 2000 [cited 2020 Nov 17];35(2):151-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10611641/>

39. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [Internet] 2015 [cited 2020 Nov 17];30, 11–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25646037/>

40. Bensadoun RJ. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Curr Opin Oncol*. [Internet] 2018 [cited 2020 Nov 17];30(4):226-232 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29794809/>

41. Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol*. [Internet] 2010 [cited 2020 Nov 17];85(6):849-55. Available from: <https://revistas.pucsp.br/index.php/dic/article/viewFile/29636/23766>

42. Atasoy KT, Korkmaz YT, Odaci E, Hanci H. The efficacy of low-level 940 nm laser therapy with different energy intensities on bone healing. Braz. oral res. [Internet] 2017 [cited 2020 Nov 08]; 31:e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28076498/>

43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Resolução RDC nº 220 de 21 de setembro de 2004. Regulamento técnico de funcionamento dos Serviços de Terapia Antineoplásica [Internet]. Brasília: Anvisa; 2004 [cited 2015 Mar 20]. Available from: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/resolucao-rdc-n-220-de-21-de-setembro-de-2004>

44. Bonassa EMA, Gato MIR. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2012.

45. BRASIL, Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria MTE nº 485, de 11 de novembro de 2005. NR 32 – Segurança e Saúde no trabalho em serviços de saúde. Available from: <http://antigo.trabalho.gov.br/pat/legislacao-pat/itemlist/category/723-portarias>

46. Valente FS. Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Porto Alegre, RS, 2014.

47. Falcão SC, Coelho ARB, Almeida EL, Galdino CAPM. Modified processo f image reproduction and amplification for measurement of area by planimetry. Application in plain wounds produced in dogs treated by occlusive skin frog dressing. Braz. J. Vet. anim. Sci. [Internet] 2001 [cited 2020 Nov 08];38(4):165-169. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000400004

48. BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018. - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Acessado em 15/11/2018. Available from: http://www.lex.com.br/legis_27616927_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_37_DE_15_DE_FEVEREIRO_DE_2018.aspx

49. Fischer ML, Agüero WP, Rodrigues GS, Simão-Silva DP, Moser AM. Enriquecimento ambiental como princípio ético nas pesquisas com animais. Rev. bioét. [Internet] 2016 [cited 2020 Nov 08]; 24 (3): 532-41. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/bioet/v24n3/1983-8042-bioet-24-03-0532.pdf>

50. Jamali J, Dayo A, Adeel A, Qureshi Y, Khan T, Begum S. A survey on gastrointestinal adverse drug reactions of Doxorubicin and Cyclophosphamide combination therapy. J Pak Med Assoc [Internet] 2018 [cited 2020 Nov 08];68(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30325912/>

51. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurigan BK, Jacob JA, Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. Life Sciences 200 [Internet] 2018 [cited 2020 Nov 08];26–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29534993/>

52. Kesik V, Kurt B, Tunc T, Karslioglu Y, Citak EC, Kismet E, Koseoglu V. Adrenomedullin worsens skin necrosis in rats subjected to vincristine-induced extravasation. Clin Exp Dermatol. [Internet] 2010 [cited 2020 Nov 08];35(8):897-901. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20345993/>

53. Hamblin, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. AIMS Biophys [Internet] 2017 [cited 2020 Nov 08]4(3): 337-361. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28748217/>

54. Hamblin MR. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. J Neurosci Res. [Internet] 2018 [cited 2020 Nov 08]; 96 (4): 731–743. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29131369/>

55. Freitas, KABS, Silva KABS, Castro AB, Lima TO, Popim, RC. Terapia por fotobiomodulação na infiltração e extravasamento de antineoplásicos: um estudo retrospectivo. Encontro Nacional de Ensino Pesquisa e Extensão, 2020. Universidade do Oeste Paulista UNOESTE. ISSN: 1677-6321.

56. Dos Santos SA, Serra AJ, Stancker TG, Simões MCB, Dos Santos Vieira MA, Leal-Junior EC, Prokic M, Vasconsuelo A, Santos SS, de Carvalho PTC. Effects of photobiomodulation

therapy on oxidative stress in muscle injury animal models: a systematic review. *Oxid Med Cell Longev*. [Internet] 2017 [cited 2020 Feb 29];5273403. Available from: <http://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2017/5273403.pdf>

57. Romero AS, Ureñad MTD, Garcíab AS, Fernándezd MTM, Porriño-Bustamantee ML, Barrerab JC. Extravasation accidents with liposomal/liposomal pegylated anthracyclines treated with dexrazoxane: an overview and outcomes. *Anti-Cancer Drugs* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 29];29:821–826. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30036190/>

58. Nilforoushzadeh MA, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Zare S, Dahmardehei M, Vaghar Doost R, et al. An open-label study of low-level laser therapy followed by autologous fibroblast transplantation for healing grade 3 burn wounds in diabetic patients. *J Lasers Med Sci*. [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 29]; 10 (Suppl 1):S7-12. Available from: <https://journals.sbmu.ac.ir/jlms/article/view/17356/pdf>

59. Cunha JLS, Carvalho FMA, Pereira Filho RN, Ribeiro MAG, Albuquerque RLC Jr. Effects of different protocols of low-level laser therapy on collagen deposition in wound healing. *Braz. dent. j*. [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 29]; 30 (4): 317-24. Available from <https://www.scielo.br/pdf/bdj/v30n4/1806-4760-bdj-30-04-317.pdf>

60. Barbosa LS, Parisi JR, Viana LC, Carneiro MB, Silva JRT, Silva ML et al. The photobiomodulation (658, 830 and 904nm) on wound healing in histomorphometric analysis. *Fisioter. mov*. [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 08];33:e003318. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/fm/v33/1980-5918-fm-33-e003318.pdf>

61. Firouzi A, Norozian M, Amini A, Abdollahifar MA, Abbaszadeh HA, Fathabadi FF. Combined effect of low-level laser treatment and levothyroxine on wound healing in rats with hypothyroidism. *J Lasers Med Sci*. [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 29];9(4):268-73. Available from: <https://journals.sbmu.ac.ir/jlms/article/view/20208/9>

62. Vasconcelos I, Schoenegg W. Massive breast necrosis after extravasation of a full anthracycline cycle. *BMJ Case Rep*. [Internet] 2013 [cited 2020 Feb 29];bcr2013201179. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822217/>

63. Ruh, A.C., Frigo, L., Cavalcanti, M.F.X.B. *et al.* Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers. *Lasers Med Sci* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 29];**33**, 165–171. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29181642/>
64. Taradaj J, Shay B, Dymarek R, Sopel M, Walewicz K, Beeckman D, et al. Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. *Int J Med Sci* [Internet] 2018 [cited 2020 Nov 08]; 15 (11): 1105-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6097266/>
65. Feitosa MCP, Carvalho AFM, Feitosa VC, Coelho IM, Oliveira RA, Arisawa EAL. Effects of the Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the process of healing diabetic foot ulcers. *Acta. cir. bras* [Internet] 2015 [cited 2020 Nov 08]; 30 (12): 852-7. Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502015001200852
66. de Carvalho PAG, Lessa RC, Carraro DM, Assis Pellizzon AC, Jaguar GC, Alves FA. Three photobiomodulation protocols in the prevention/treatment of radiotherapy-induced oral mucositis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* [Internet] 2020 [cited 2020 Feb 29];31:101906. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-32619713>
67. Tam SY, Tam VCW, Ramkumar S, Khaw ML, Law HKW, Lee SWY. Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Front Oncol.* [Internet] 2020 [cited 2020 Feb 29];10:1255. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01255/full>
68. Scherer NHB, Silva AMV, Gutierrez J, Veloso CF, Pinfildi CE, Gobbato RC. Laser Photobiomodulation in the acute inflammatory response of the calcaneal tendon injury in rats exposed to cigarette smoke. *Fisioter. Pesqui.* [Internet] 2019 [cited 2020 Nov 08]; 26 (2): 164-9. D Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-29502019000200164

ANEXO

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "INFLUÊNCIA DA TERAPIA A LASER SOBRE A FERIDA CUTÂNEA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR" **Protocolo CEUA 0026/2019**, a ser conduzido por KARINA ALEXANDRA BATISTA DA SILVA FREITAS, responsável/orientador PROF. ADJ REGINA CÉLIA POPIM, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/05/2019 a 01/05/2020
Nome Comum / Espécie / Linhagem	RATO / RATTUS NOVERGICUS / ALBINA
Raça	WISTAR
Nº de animais machos	120
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	300 G
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 3 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	IBTEC (Biotério de Criação) - UNESP - Botucatu

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/02/2019

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3580-2176 - patricia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br