



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

ANA CLAUDIA KAMIMURA FURLAN

**Efeitos da fotobiomodulação sobre o tecido após implantação do ácido
hialurônico: estudo em modelo animal**

**Effects of photobiomodulation on tissue after hyaluronic acid implantation:
study in an animal model**

**MARINGÁ
2022**



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

ANA CLAUDIA KAMIMURA FURLAN

**Efeitos da fotobiomodulação sobre o tecido após implantação do ácido
hialurônico: estudo em modelo animal**

**Effects of photobiomodulation on tissue after hyaluronic acid implantation:
study in an animal model**

Dissertação formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia (Harmonização Orofacial)

Orientador: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

**MARINGÁ
2022**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Antônio Claudio Furlan, minha inspiração e exemplo. Quem me incitou a seguir a área acadêmica e sempre me manter atualizada. Meu maior incentivador.

À minha mãe, Edna Kamimura Furlan, por ser tão amorosa, deixando tudo sempre mais leve com sua paciência e compreensão.

Ao meu irmão Luiz Eduardo Kamimura Furlan, que mesmo sendo mais novo e ter uma caminhada mais curta profissionalmente, me motiva a ser cada dia melhor.

E finalmente, mas não menos importante, ao meu esposo, Celso Eduardo Mazzer, por sempre me encorajar e estar ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grata primeiramente à Deus, pela vida e por ser minha rocha em meio aos desafios.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa, por toda a paciência, dedicação, competência e amor. Juntamente com o Prof. Dr. Ricardo Albergaria Barbosa, foram fundamentais para meu amadurecimento e evolução durante esta jornada.

À Profa. Liciane Belo, por ser grande responsável pelo amor crescente que tenho pela Fotobiomodulação, e por ser parte idealizadora desta pesquisa.

À Profa. Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida, do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, pela disposição e prontidão em ajudar com as análises histológicas. Seu conhecimento e competência foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os envolvidos nesta pesquisa, especialmente à amiga Rachel Bernardo pela parceria e cumplicidade em todos os momentos do experimento e do mestrado em si.

Aos meus colegas de turma, com os quais aprendi e cresci imensuravelmente a cada módulo convivido.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Introdução: Ainda são escassos protocolos consistentes utilizando a fotobiomodulação no tratamento dos eventos adversos ocasionados com implantes de ácido hialurônico. **Objetivo:** Investigar as reações teciduais após implantação de AH em tecido de derme profunda e hipoderme tratada com AH e AH com fotobiomodulação. **Material e Métodos:** O estudo experimental foi conduzido com 70 fêmeas de ratos (*Wistar isogênicos*), saudáveis e sem nenhum tipo de alteração genética ou mutação, com idade de 180 dias e peso variando entre 250 e 300 gramas. Os animais foram distribuídos em 5 grupos de forma aleatória: CN: sem nenhum tratamento, CP: injeção de AH, G1: Injeção de AH + irradiação de LV, G2: Injeção de AH + irradiação de LIV, G3: Injeção de AH + irradiação de LV e LIV. **Resultados:** A área de colágeno tipo I foi maior para CP (19,54) quando comparados os grupos G1 (12,29), G2 (12,79) e G3 (11,34) ($p < 0,001$). Para o colágeno tipo III, CP apresentou maior área comparando-se todos os tempos e grupos (Cp2, Cp4 e Cp6: 22,84; 25,75; 21,40, respectivamente; $p < 0,001$). **Conclusão:** Há um efeito potencialmente favorável à produção de colágeno a partir da injeção de ácido hialurônico e o tratamento com a injeção de ácido hialurônico associado à fotobiomodulação com laser vermelho e infravermelho, ao contrário do ácido hialurônico submetido apenas terapia isolada com laser vermelho e/ou infravermelho.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Colágeno. Fotobiomodulação. Terapia de Luz de Baixa Potência.

ABSTRACT

Introduction: There are still few consistent protocols using photobiomodulation in the treatment of adverse events caused by hyaluronic acid implants. **Objective:** To investigate tissue reactions after HA implantation in deep dermis and hypodermis tissue treated with HA and HA with photobiomodulation. **Material and Methods:** The experimental study was conducted with 70 female rats (isogenic Wistar), healthy and without any type of genetic alteration or mutation, aged 180 days and weighing between 250 and 300 grams. The animals were randomly distributed into 5 groups: CN: no treatment, CP: HA injection, G1: HA injection + LV irradiation, G2: HA injection + LIV irradiation, G3: HA injection + irradiation of LV and LIV. **Results:** The type I collagen area was greater for CP (19.54) when comparing groups G1 (12.29), G2 (12.79) and G3 (11.34) ($p < 0.001$). For type III collagen, CP had the largest area comparing all times and groups (CpT2, CpT4 and CpT6: 22.84; 25.75; 21.40, respectively; $p < 0.001$). **Conclusion:** There is a potentially favorable effect on collagen production from the injection of hyaluronic acid and the treatment with the injection of hyaluronic acid associated with photobiomodulation with red and infrared laser, unlike hyaluronic acid subjected only to isolated therapy with red laser and/or or infrared.

Keywords: Hyaluronic acid. Collagen. Photobiomodulation. Low Power Light Therapy.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 1 - | a) Área de eleição para implantação de AH, em região dorsal, após tricotomia, medindo aproximadamente 3X3 cm. b) Implantação de AH em <i>bolus</i> , na região central da área de eleição..... | 18 |
| Figura 2 - | Irradiação de laser na região previamente tratada com implantação de AH..... | 19 |
| Figura 3 - | Amostra de tecido em excisão para análise histológica..... | 21 |
| Figura 4 - | Fluxograma do desenho experimental do estudo..... | 23 |
| Figura 5 - | Cortes histológicos (20x) do grupo CP nos tempos t2 (a) e t6 (b) | 24 |
| Figura 6 - | Cortes histológicos (20x) do grupo CP nos tempos t2 (a) e t6 (b) | 25 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Comparação entre os grupos (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey)..... **20**
- Tabela 2** - Comparação entre as diferentes irradiações (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey)..... **26**
- Tabela 3** - Comparação entre tempos de eutanásia (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey)..... **27**

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|------|-----------------------------|
| AH | Ácido Hialurônico |
| cm | Centímetros |
| °C | Graus Celsius |
| CN | Controle Negativo |
| CP | Controle Positivo |
| G1 | Grupo Um |
| G2 | Grupo Dois |
| G3 | Grupo Três |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| LV | Laser Vermelho |
| LIV | Laser Infravermelho |
| TFBM | Terapia de Fotobiomodulação |
| t0 | Tempo Zero |
| t1 | Tempo Um |
| t2 | Tempo Dois |
| t3 | Tempo Três |
| t4 | Tempo Quatro |
| t5 | Tempo Cinco |
| t6 | Tempo Seis |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2. ARTIGO..... | 14 |
| 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 32 |
| 4. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE..... | 33 |
| REFERÊNCIAS..... | 33 |

1. INTRODUÇÃO

O polímero de Ácido Hialurônico (AH) tem sido amplamente utilizado como preenchedor dérmico voltado à estética e controle dos sinais de envelhecimento. Trata-se de um glicosaminoglicano de alto peso molecular que representa o principal componente da matriz extracelular, influenciando sua permeabilidade. É composto por ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina, unidos alternadamente por ligações β (RZANY *et al.*, 2009; DUNN *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; WOHLRAB *et al.*, 2012).

Com o processo de senescência, os compartimentos de gordura superficial e profunda vão sofrendo reabsorção, assim como o tecido ósseo. Além disso, ocorrem alterações importantes nas fibras de colágeno e elastina, e redução expressiva do AH cutâneo, resultando na perda de volume facial, ptose dos tecidos e surgimento de ríides e rugas. Atualmente, o preenchimento com AH se tornou o tratamento de escolha para volumização facial por várias razões: está disponível em todas as espécies, seu efeito é imediato, e, quando necessário, pode ser reversível (CASSUTO; SUNDARAM, 2013). No entanto, quando aplicado em profundidades incompatíveis com sua reticulação ou em algumas condições específicas do hospedeiro, o AH pode desenvolver intercorrências e efeitos adversos importantes que devem ser controlados e dirimidos (JUNKINS-HOPKINS, 2010; GUTMANN; DUTRA, 2018).

Um dos principais fármacos utilizados no controle de intercorrências relacionadas ao AH é a hialuronidase (BRODY, 2005). Trata-se de uma proteína solúvel que promove a degradação enzimática do AH e diminui o desconforto da injeção subcutânea ou intramuscular, acelerando seu processo de reabsorção (RZANY *et al.*, 2009). Age despolimerizando reversivelmente o AH existente ao redor das células do tecido conjuntivo, reduzindo assim temporariamente a viscosidade desse tecido e tornando-o mais permeável à difusão de fluidos (LEE *et al.*, 2010). Com base nesse mecanismo de ação, a hialuronidase passou a ser utilizada como forma de tratamento para promover a degradação do AH nos casos de complicações e/ou reações adversas (NERI *et al.*, 2013). No entanto, esse produto também pode ser causa de efeitos

adversos, representados principalmente pelas reações no local da aplicação, e nem sempre pode ser utilizado. Existe referência na literatura de algumas complicações inerentes ao uso da hialuronidase, como angioedema e urticária, risco potencial de encefalopatia espongiosa (BRODY, 2005; JONES *et al.*, 2010) e processos alérgicos (ALMEIDA; SALIBA, 2015).

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) através do uso de laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), que em português significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”, pode ser uma boa opção em substituição ao uso da hialuronidase. As principais características do laser são: feixe colimado, luz coerente, e, em grande parte dos lasers, luz monocromática, podendo ser contínuo ou pulsado. Existem diferentes tipos de laser para uso em saúde, cujas finalidades terapêuticas variam de acordo com o comprimento de onda emitida e potência aplicada. Os fótons emitidos pelo laser são absorvidos por fotorreceptores específicos, estimulando a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, iniciando uma série de reações citoplasmáticas ou da membrana celular. Essas alterações moleculares aceleram o processo de diferenciação e proliferação celular, aumentam a síntese de proteínas, levando aos principais efeitos da TFBM: efeito analgésico, circulatório, modulador de processos inflamatórios e reparo tecidual (RABELO *et al.*, 2006).

De modo geral, os lasers podem ser classificados em laser de alta potência e laser de baixa potência. A prática clínica da terapia com laser de baixa potência tem sido utilizada há aproximadamente 20 anos (RABELO *et al.*, 2006). Observou-se que o comprimento de onda é a característica mais importante da radiação laser, pois determina em quais biomoléculas vai interagir (VLADIMIROV *et al.*, 2004; AMAT *et al.*, 2006).

A radiação visível no comprimento de onda do vermelho (600–700nm) atua em uma via mitocondrial, e a invisível do infravermelho próximo (770-1200nm), tem ação sobre cromóforos da membrana celular. Portanto, os efeitos terapêuticos são específicos, o que leva a crer que exista possibilidade de se utilizar ambas as vias de estimulação com objetivo de incrementar resultados (PIVA *et al.*, 2011).

A TFBM também parece ser eficiente no incremento da vascularização local e exerce efeitos anti-inflamatórios nos processos iniciais da cicatrização, como a redução de mediadores químicos (PGE2, histamina), de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF α), diminuição da migração de células inflamatórias (leucócitos, neutrófilos), redução do edema e incremento de fatores de crescimento (FCF, bFGF, IGF-1, IGFBP3), contribuindo diretamente para o processo de reabilitação tecidual (PIVA *et al*, 2011).

A TFBM pode representar uma importante ferramenta ao clínico nas intercorrências relacionadas à harmonização orofacial, principalmente naquelas relacionadas ao AH. Isto evitaria o uso da hialuronidase, que também pode gerar efeitos adversos em algumas condições clínicas. Entretanto, poucos estudos randomizados e conduzidos em cego fazem referência à sua eficácia quanto a esta finalidade, principalmente quando o laser vermelho e infravermelho é utilizado isoladamente ou de forma associada. Um estudo realizado neste sentido poderá contribuir com a prática clínica, uma vez que, junto aos demais conhecimentos sobre os protocolos e técnicas empregados, permitirão extrapolar os resultados para as atividades de harmonização orofacial.

Não há uma padronização na terapia de fotobiomodulação para o tratamento das complicações relacionadas ao uso de ácido hialurônico. De modo particular, quando se refere à eficiência do laser vermelho (LV) em relação ao laser infravermelho (LIV), ou quando na associação de ambos. Portanto, esses parâmetros não se encontram totalmente esclarecidos na literatura.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar as reações teciduais após implantação de AH em tecido de derme profunda e hipoderme tratada com AH e AH com fotobiomodulação.

2. ARTIGO

O artigo apresentado foi escrito de acordo com as normas da Revista:

Lasers in Medical Science (LIMS)

Efeitos da fotobiomodulação sobre o ácido hialurônico: estudo em modelo animal

Ana Claudia Kamimura Furlan¹ Célia M. Rizzatti-Barbosa¹

¹ Programa de Mestrado Profissional em Odontologia do Centro Universitário Ingá, Brasil

Abstract

Ainda são escassos protocolos consistentes utilizando a fotobiomodulação no tratamento dos eventos adversos ocasionados com implantes de ácido hialurônico. O objetivo deste estudo foi investigar as reações teciduais após implantação de AH em tecido de derme profunda e hipoderme tratada com AH e AH com fotobiomodulação. O estudo experimental foi conduzido com 70 fêmeas de ratos (*Wistar isogênicos*), saudáveis e sem nenhum tipo de alteração genética ou mutação, com idade de 180 dias e peso variando entre 250 e 300 gramas. Os animais foram distribuídos em 5 grupos de forma aleatória: CN: sem nenhum tratamento, CP: injeção de AH, G1: Injeção de AH + irradiação de LV, G2: Injeção de AH + irradiação de LIV, G3: Injeção de AH + irradiação de LV e LIV. A área de colágeno tipo I foi maior para CP (19,54) quando comparados os grupos G1 (12,29), G2 (12,79) e G3 (11,34) ($p < 0,001$). Para o colágeno tipo III, CP apresentou maior área comparando-se todos os tempos e grupos (CPt2, CPt4 e CPt6: 22,84; 25,75; 21,40, respectivamente; $p < 0,001$). Há um efeito potencialmente favorável à produção de colágeno a partir da injeção de ácido hialurônico e o tratamento com a injeção de ácido hialurônico associado à fotobiomodulação com laser vermelho e infravermelho, ao contrário do ácido hialurônico submetido apenas terapia isolada com laser vermelho e/ou infravermelho.

Keywords: Ácido hialurônico. Fotobiomodulação. Laser vermelho. Laser infravermelho.

Introdução

Os preenchimentos dérmicos à base de ácido hialurônico são produtos de preenchimento orofacial com propriedades viscoelásticas exclusivas destinadas a corresponder às indicações específicas para a região a que se deve corrigir [1]. São géis injetáveis que tem por finalidade preencher os tecidos moles com o objetivo de corrigir depressões tissulares, reabsorção óssea e atrofiamento dos compartimentos de gordura. Por tanto, são destinados a neutralizar o processo de envelhecimento e perda de tecido subcutâneo [2,3].

Todos os preenchedores dérmicos à base de ácido hialurônico (AH) tem atraído atenção nas últimas décadas devido aos efeitos visuais imediatos, que quando bem planejado promove aparência natural na pele, além de terem se mostrado seguros, duradouros e fáceis de usar, sejam isoladamente ou em tratamentos combinados [4,5,6].

À medida que aumentaram os procedimentos estéticos faciais, novos paradigmas de tratamento também tiveram que evoluir para tratar os eventos adversos decorrentes dos preenchimentos faciais com AH, mesmo quando estes apresentam perfis de segurança como ponto favorável ao seu uso. Apesar dos efeitos adversos serem raros, pode ocorrer na prática clínica e não saber reconhecê-los podem gerar complicações mais graves [7,8].

Atualmente o uso de lasers de baixa potência está se tornando cada vez mais popular no tratamento de uma variedade de condições médicas e estéticas, incluindo a cicatrização de feridas [9] por meio da redução do edema tecidual e da inflamação, aumento fagocitose, deposição de colágeno e síntese de proteínas [10], epitelização [11], e melhora a resistência à tração de tecidos [12].

Ainda não há na literatura atual protocolos consistentes utilizando a fotobiomodulação no tratamento dos eventos adversos ocasionados com implantes de ácido hialurônico. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar as reações teciduais após implantação de AH em tecido de derme profunda e hipoderme tratada com AH e AH com fotobiomodulação.

Materiais e métodos

Animais

O trabalho foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Ingá (Aprovação nº 99/2020).

Foram adquiridos 70 ratos fêmea da linhagem *HanUnib, WH (Wistar)*, no Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e transportados em carro climatizado (22°C), em gaiolas de polipropileno até o Biotério do Centro Universitário Ingá, Maringá, Paraná, Brasil, de acordo com a Resolução Normativa do Concea, n. 25, 2016.

Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental conduzido com 70 fêmeas de ratos (*Wistar* isogênicos), saudáveis e sem nenhum tipo de alteração genética ou mutação, com idade de 180 dias e peso variando entre 250 e 300 gramas. Os animais foram distribuídos em 5 grupos de forma aleatória: CN: sem nenhum tratamento, CP: injeção de AH, G1: Injeção de AH + irradiação de LV, G2: Injeção de AH + irradiação de LIV, G3: Injeção de AH + irradiação de LV e LIV.

As variáveis independentes estudadas são: laser vermelho, laser infravermelho e associação de ambos. As variáveis dependentes foram: a análise subjetiva dos tecidos tratados obtida por exames histoquímicos e a quantificação dos tipos de colágeno I e III através do programa analisador de imagens Image-Pro[®] Plus.

Grupos experimentais

Considerando as variáveis independentes, tipos de irradiações e número de irradiações, os grupos experimentais foram subdivididos. Os animais, que foram aleatoriamente enumerados de 1 a 70, foram distribuídos da seguinte forma: de 1 a 5 (CN – eutanasiados em t0), 6 a 10 (CP – eutanasiados em t0), 11 a 15 (CP – eutanasiados em t2), 16 a 20 (CP – eutanasiados em t4), 21 a 25 (CP – eutanasiados em t6), 26 a 30 (G1 – 1 LV – eutanasiados em t2), 31 a 35 (G1 – 3 LV – eutanasiados em t4), 36 a 40 (G1 – 5 LV – eutanasiados em t6), 41 a 45 (G2 – 1 LIV – eutanasiados em t2), 46 a 50 (G2 – 3 LIV –

eutanasiados em t4), 51 a 55 (G2 – 5 LIV – eutanasiados em t6), 56 a 60 (G3 – 1 LV + LIV – eutanasiados em t2), 61 a 65 (G3 – 3 LV + LIV – eutanasiados em t4), 66 a 70 (G3 – 5 LV + LIV – eutanasiados em t6).

Todos os animais, com exceção do CN, tiveram a implantação do AH em t0, e os ratos de 6 a 10 (CP) também foram eutanasiados em t0, juntamente com o CN.

As irradiações aconteceram em dias consecutivos, enquanto as eutanásias em dias alternados, estas iniciando-se 24h após a irradiação do laser, que por sua vez teve início 24h após implantação do AH.

Preparo dos modelos animais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em “subgrupos” de 5 entre os grupos CN, CP, G1, G2 e G3, e permaneceram no biotério do Centro Universitário Ingá (Maringá, PR, Brasil), alojados em caixas de plástico (50x50x55cm) forradas com maravalha tratada, em condições laboratoriais padrão (temperatura ambiente 20 ± 2 ° C e umidade $72 \pm 4\%$), em ciclo 12 horas claro/12 horas escuro, com acesso irrestrito a água e ração comercial balanceada (Nuvital[®] Nutrientes Ltda) para ratos com sedimento padrão 53-3, produzido de acordo com a ISO 9001 (2008).

Foram submetidos há 7 dias de aclimatação antes do início do estudo, e a saúde dos animais bem como as condições do biotério foram monitorados regularmente por profissional do biotério devidamente treinados para este fim, de acordo com os requisitos da ISO 10993-10 (2007). Nenhum animal foi descartado do experimento.

Cada gaiola conteve no máximo três animais, identificadas com os grupos e números deles, de acordo com o desenho experimental. O estudo foi conduzido no biotério do Centro Universitário Uningá – Maringá (PR, Brasil) por um operador previamente treinado e calibrado para esta finalidade.

Para a realização dos procedimentos de implantação do AH, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Dopalen[®] (50mg/mL) e Rompun[®] (2g/100mL) na proporção de 1:1 na dose de 0,3mL/100g de massa corporal

(Dopalen[®], Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínia – SP, Brasil / Rompun[®], Bayer S.A, São Paulo – SP, Brasil), o que permitiu um bom tempo de trabalho, suficiente para a realização do procedimento. Todos os animais receberam um número feito em Henna no dorso da cauda, que configura o grupo experimental a que pertencem.

A aplicação de AH seguiu protocolo padronizado para os grupos CP, G1, G2 e G3. Utilizou-se um ácido hialurônico de alta reticulação (Restylane Lyft - Galderma[®]). A implantação de 0,1mL do produto foi feita na região dorsal do animal, dentro de uma área de aproximadamente 3x3cm, previamente tricotomizada (Figura 1a). Na porção medial desta área, fez-se um pertuito com agulha de 21G, e a injeção do AH foi feita 9em forma de um único *bolus* uniforme, através de uma cânula de 22G inserida em plano subcutâneo, mais especificamente entre o panículo carnosos e a aponeurose do músculo dorsal do animal, até um centímetro para anterior, a partir do ponto de pertuito (Figura 1b).

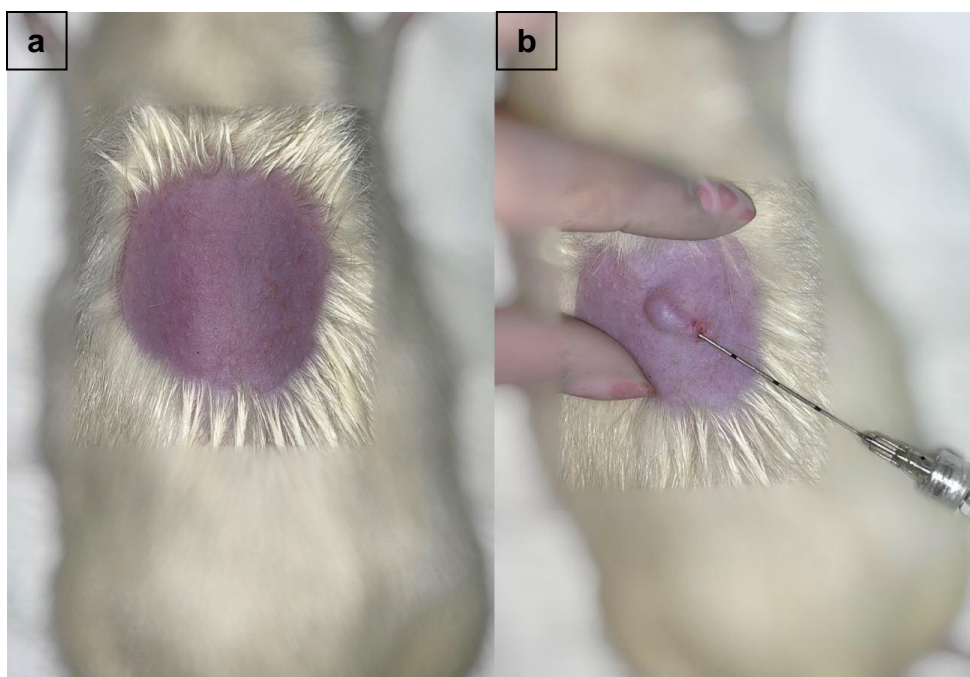


Figura 1. a) Área de eleição para implantação de AH, em região dorsal, após tricotomia, medindo aproximadamente 3X3 cm. **b)** Implantação de AH em *bolus*, na região central da área de eleição.

Protocolo de fotobiomodulação (Terapia de Laser de Baixa Intensidade)

Os tratamentos com laser vermelho e/ou infravermelho foram realizados através do aparelho de Laser DuoMMO[®] portátil (MMOptics Ltda., São Carlos – SP, Brasil), em modo de operação contínuo, ângulo de 90° em contato com a pele do animal (sobre o AH injetado anteriormente), dosimetria de 3J por ponto, e comprimentos de onda 660nm (laser vermelho) e 808nm (laser infravermelho). As irradiações de laser foram feitas com os animais imobilizados pelo médico veterinário, com o uso das mãos sobre a cabeça e cauda em dias consecutivos, 24h horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas após implantação do AH, seguindo os parâmetros descritos na Tabela 1 e ilustrados na Figura 2.

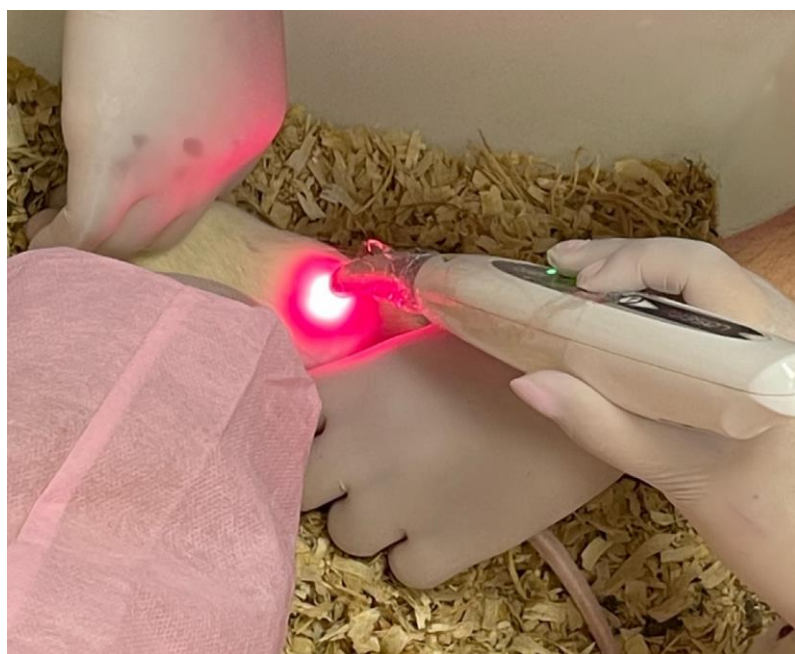


Figura 2. Irradiação de laser (vermelho) na região previamente tratada com implantação de AH

Tabela 1. Parâmetros do aparelho de Laser

| Parâmetro | Valor |
|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Informação do aparelho</i> | |
| Fabricante | MM Optics Ltda |
| Modelo | Laser Duo |
| Emissor de luz | GaAIAs e InGaAIP |
| Comprimento de onda | 660nm±10nm e 808nm±10nm |
| Formato do feixe | Circular |
| Área do feixe | 0,03cm ² |
| Potência ótica dos lasers | 100mW±20%? |
| Modo de operação | Contínuo |
| <i>Parâmetros do tratamento</i> | |
| <i>Irradiância</i> | 3,33 W/cm ² |
| <i>Duração da exposição</i> | 30s/ponto |
| <i>Dose</i> | 3J/ponto |
| <i>Dose</i> | 100J/cm ² |
| <i>Número de pontos por sessão</i> | 1 |
| <i>Técnica de aplicação</i> | Em contato – 90° |
| <i>Número de sessões</i> | 1 a 5 |
| <i>Frequência das sessões</i> | 24/24h |

Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada através de injeção intraperitoneal de uma mistura de Dopalen[®] (50mg/mL) e Rompun[®] (2g/100mL) na proporção de 1:1 na dose de 0,3mL/100g de massa corporal. Quando apresentaram sinais de anestesia geral, realizou-se a punção cardíaca nos animais. Imediatamente após parada cardiorrespiratória, removeu-se uma área de aproximadamente 3x3cm de tecido para avaliação histológica (Figura 3), e os animais foram, então, acomodados em sacos identificados, armazenados em *freezer* e destinados à coleta pela empresa responsável (ServiOest). A eutanásia e coleta da amostra tecidual foram feitas em 5 animais de cada grupo, em dias alternados: 0 horas (T0), 48 horas (T2), 96 horas (T4) e 144 horas (T6) após aplicação do AH.

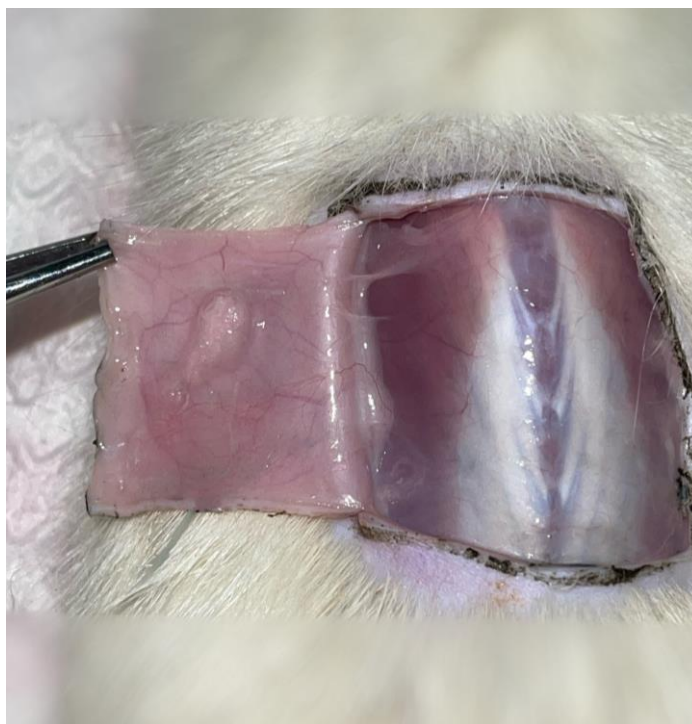


Figura 3. Amostra de tecido em excisão para análise histológica

Preparo e coloração das lâminas histológicas

A avaliação histológica foi realizada no Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Maringá. Fragmentos de pele foram fixados em formadeído tamponado a 10%, desidratadas em soluções de concentrações

crescentes de álcoois (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Os cortes histológicos, com espessura de 5 µm, foram obtidos em micrótomo (American Optical, modelo 820) e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), para avaliação da morfologia geral, e Picrosirius Red para detecção dos colágenos tipo I e III.

Para a coloração em Picrosirius, as lâminas foram desparafinadas em 100% de xileno, lavadas com etanol 100% e em água. Em seguida, foram submersas em 0,1% de SiriusRed F3BA (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) em ácido pícrico saturado por 1 hora em temperatura ambiente. Foi realizada lavagem para remoção do excesso de corante e imersas em HCl 0,1 N por 2 minutos seguido por outra lavagem em água. Por fim, as lâminas foram desidratadas com etanol e xileno e secas a temperatura ambiente até leitura microscópica.

Microscopia e captura da imagem

As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse[®], Shimjuku, Japão), acoplado em câmera de alta resolução (Nikon[®] Ds-Fi1C, Shimjuku, Japão). As imagens digitais foram capturadas em programa específico (NIS-Elements versão 4.0, Praga, República Checa). Para quantificação do colágeno, os cortes histológicos foram avaliados sob luz polarizada, na objetiva de 40X, onde as fibras de colágeno coradas exibiam coloração desde verde brilhante até vermelho.

Quantificação do Colágeno

Avaliou-se 20 imagens por animal e quantificou-se a área ocupada pelo colágeno do tipo I (vermelho, laranja, amarelo) e pelo colágeno do tipo III (verde), separadamente, através do software Image-Pro[®] Plus (versão 4.5 – Media Cybernetics). Os resultados foram expressos pela área ocupada por cada tipo de colágeno em relação à área total analisada.

Análise Estatística

O resumo do delineamento experimental e dos procedimentos realizados pode ser visto no fluxograma (Figura 4).

Foi realizada análise de variância para as variáveis avaliadas e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o *software* Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, Okla, EUA).

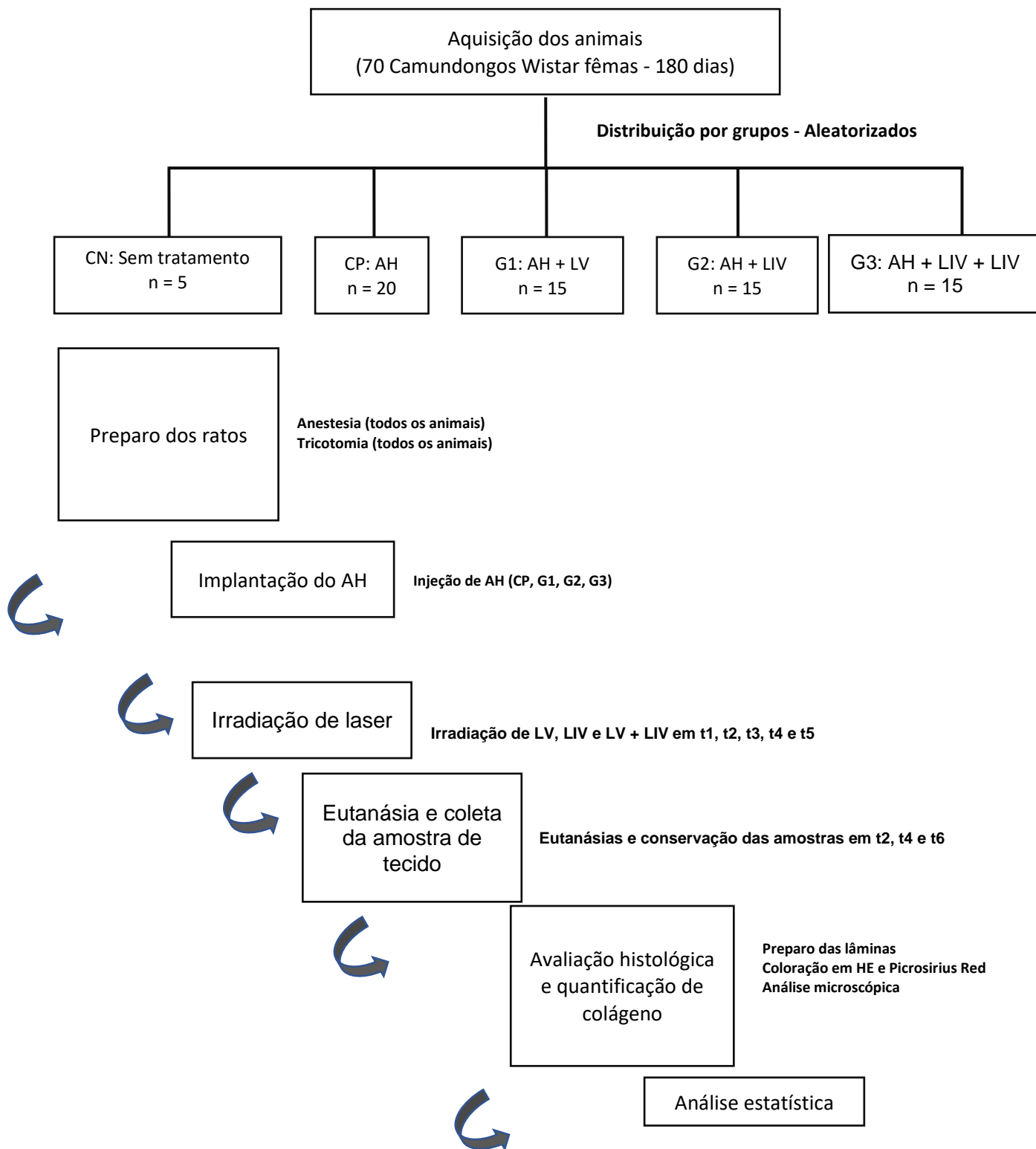


Figura 4. Fluxograma do desenho experimental do estudo

Resultados

Avaliação histológica

Ao avaliar as lâminas coradas em HE dos grupos do estudo em questão, foi possível comparar, numa análise qualitativa, a quantidade de células inflamatórias nos diferentes tempos e tratamentos realizados, assim como a organização dos fibroblastos e das fibras colágenas ao redor do AH injetado.

Dentro de um mesmo grupo, com o passar dos dias, notou-se diminuição nas células inflamatórias e aumento na quantidade e organização das fibras colágenas. Além disso, observa-se a presença de maior número de vasos sanguíneos (Figura 5).

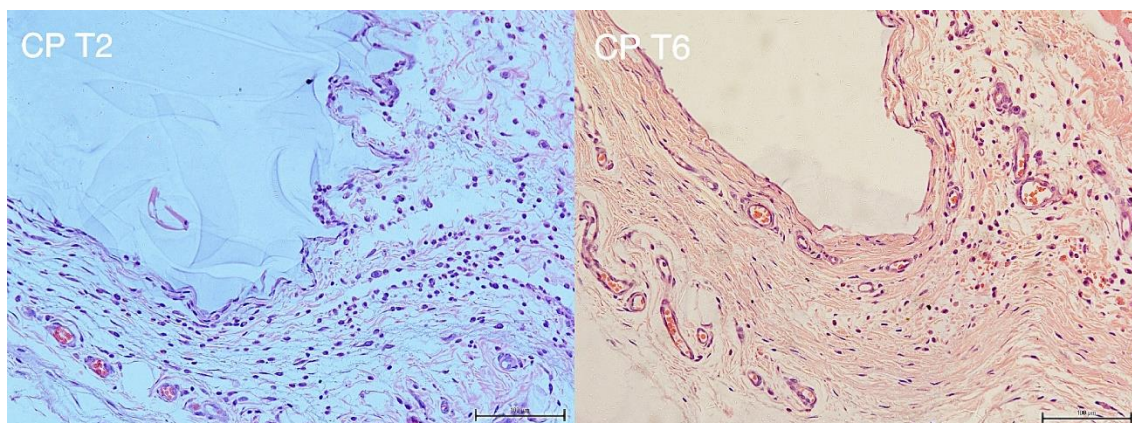


Figura 5. Cortes histológicos (20x) do grupo CP nos tempos t2 (a) e t6 (b). Observam-se mais células inflamatórias em t2. Já em t6, menos células inflamatórias, fibras colágenas em maior quantidade e mais organizadas, e maior número de vasos sanguíneos.

Relacionando-se os grupos de tratamento em um mesmo tempo, ou seja, comparando o mesmo momento em CP e nos grupos que receberam irradiações de laser, percebe-se que G1, G2 e G3 possuem tecido menos inflamado, fibroblastos e fibras colágenas mais organizadas ao redor do AH (Figura 6).

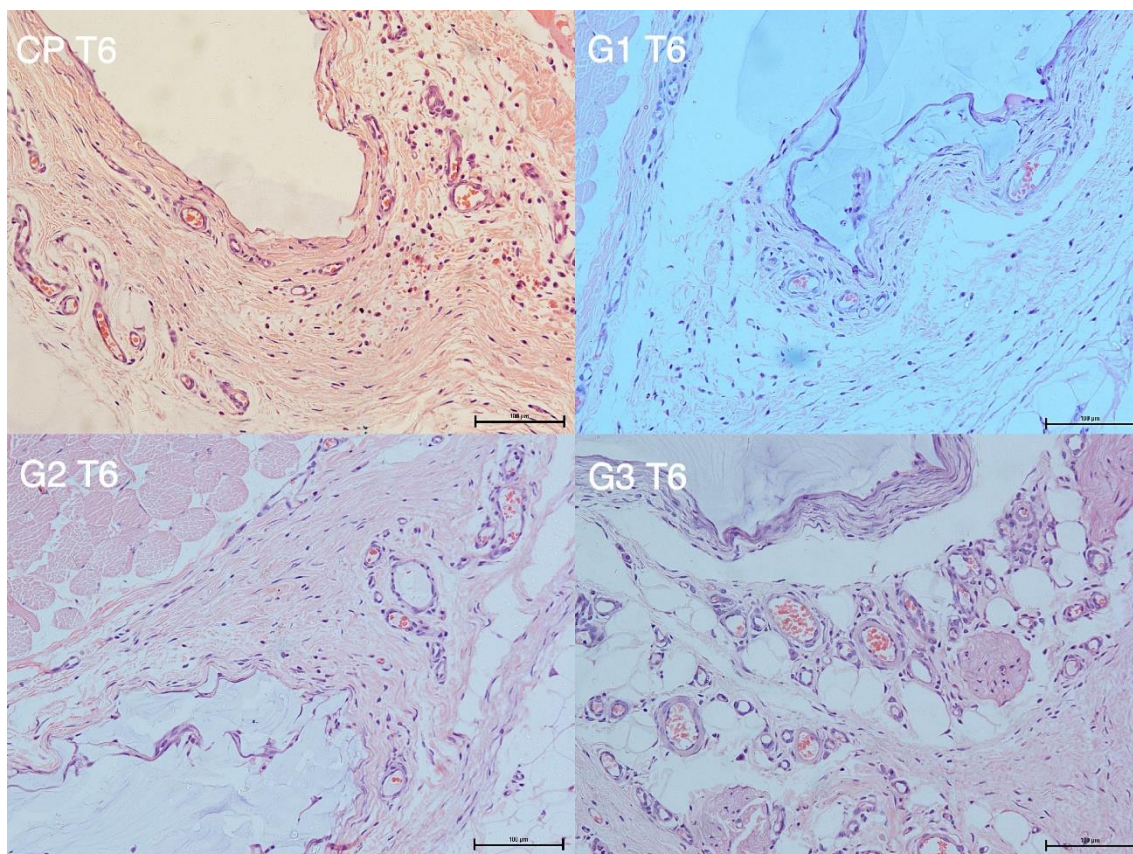


Figura 6. Cortes histológicos (20x) dos grupos CP (a), G1 (b), G2 (c) e G3 (d), todos em t6. Observa-se diminuição da inflamação e aumento das fibras colágenas, assim como uma maior organização das mesmas ao redor do AH quando se compara CP com os grupos que passaram por TFBM.

Análise do colágeno

A área de colágeno tipo I em t2, quando comparados os grupos CP (19,54), G1 (12,29), G2 (12,79) e G3 (11,34), apresentou-se maior em CP ($p < 0,001$), ou seja, no grupo que não passou por irradiação de laser. A mesma relação foi percebida em t4 (18,87, $p < 0,001$). Já em t6, comparando CP com os grupos que receberam 5 irradiações de laser, o grupo G1(AH+LV) demonstrou inferioridade em relação aos demais (10,01, $p = 0,001$) (Tabela 2).

Analisando o colágeno tipo III, CP apresentou maior área comparando-se todos os tempos e grupos (CPT2, CPT4 e CPT6: 22,84; 25,75; 21,40, respectivamente; $p < 0,001$). Além disso, houve pouca variação no percentual de colágeno tipo III para os grupos G1t2 e G2t2 (12,54 e 13,55, respectivamente) embora essa diferença seja estatisticamente significativa ($p < 0,001$). O mesmo comportamento ocorreu em G1t4 e G2t4 (9,65 e 10,57,

respectivamente, $p < 0,001$) e G1t6 e G2t6 (10,17 e 12,96, respectivamente, $p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre os grupos (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

| | CP | G1 | G2 | G3 | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| | Média | Média | Média | Média | p |
| | (DP) | (DP) | (DP) | (DP) | |
| Colágeno I | 19,54 | 12,29 | 12,79 | 11,34 | <0,001 |
| T2 | (5,31) A | (5,47) B | (4,99) B | (3,31) B | |
| Colágeno III | 22,84 | 12,54 | 13,55 | 17,46 | <0,001 |
| T2 | (12,99) A | (10,97) B | (10,86) B | (11,26) AB | |
| Colágeno I | 18,87 | 12,22 | 15,89 | 11,94 | <0,001 |
| T4 | (9,33) A | (3,41) B | (3,63) C | (3,85) A | |
| Colágeno III | 25,75 | 9,65 | 10,57 | 17,52 | <0,001 |
| T4 | (16,80) A | (8,83) B | (7,10) B | (12,08) C | |
| Colágeno I | 16,47 | 10,01 | 16,39 | 15,26 | <0,001 |
| T6 | (6,03) A | (3,42) B | (6,04) A | (7,03) A | |
| Colágeno III | 21,40 | 10,17 | 12,96 | 16,38 | <0,001 |
| T6 | (15,13) A | (8,17) B | (9,37) B | (10,71) A | |

* Estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

Letras diferentes numa mesma linha indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Relacionando os tempos de eutanásia, e conseqüentemente o número de irradiações, dentro de um mesmo grupo, observamos que: em G1, a área total de colágeno tipo I em t2 e t4 foi similar (12,29 e 12,22, respectivamente; $p = 0,023$), e maior do que em t6 (10,01; $p = 0,023$). Já em G2t2 demonstrou menor área de colágeno I (12,79) do que t4 e t6 (15,89 e 16,39, respectivamente, $p < 0,001$). Em G3, t6 apresentou maior área de colágeno tipo I (15,26) quando comparado com t2 e t4 (11,34 e 11,94, respectivamente, $p < 0,004$) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre os tempos de eutanásia de cada grupo (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

| | T2 | T4 | T6 | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| | Média | Média | Média | p |
| | (DP) | (DP) | (DP) | |
| Colágeno I | 12,29 | 12,22 | 10,01 | 0,023 |
| G1 | (5,47) A | (3,41) A | (3,42) B | |
| Colágeno III | 12,54 | 9,65 | 10,17 | 0,335 |
| G1 | (10,97) A | (8,83) A | (8,17) A | |
| Colágeno I | 12,79 | 15,89 | 16,39 | <0,001 |
| G2 | (4,99) A | (3,63) B | (6,04) B | |
| Colágeno III | 13,55 | 10,57 | 12,96 | 0,248 |
| G2 | (10,86) A | (7,10) A | (9,37) A | |
| Colágeno I | 11,34 | 11,94 | 15,26 | 0,004 |
| G3 | (3,31) A | (3,85) A | (7,03) B | |
| Colágeno III | 17,46 | 17,52 | 16,38 | 0,817 |
| G3 | (11,26) B | (12,08) B | (10,71) A | |

* Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

Letras diferentes numa mesma linha indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Para a área de colágeno tipo III, não houve diferença significativa entre os grupos e tempos de eutanásia (G1: $p=0,335$; G2: $p=0,248$; G3: $p=0,817$). Em uma análise qualitativa, comparando as capturas dos cortes histológicos dos grupos G1, G2 e G3, notou-se aumento na deposição de colágeno entre os tempos t2 e t6 (Figura 5). Já no grupo CP, a espessura do colágeno sobre o AH é semelhante entre os mesmos tempos (Figura 6). Comparando CP com os grupos irradiados foi possível observar que CP apresentou mais colágeno, demonstrando que a injeção de AH causa reação inflamatória com deposição de colágeno por segunda intenção.

Discussão

A matriz extracelular colágena dérmica compreende a maior parte da pele, sendo responsável por promover força e resiliência. No entanto, esta estrutura sofre fragmentação gradual ao longo dos anos, comprometendo as

propriedades mecânicas da pele e as funções das células dérmicas, como, por exemplo, os fibroblastos [13]. De tal maneira, os procedimentos estéticos que envolvem a implantação do ácido hialurônico se tornaram comuns nas clínicas estéticas, isso porque são capazes de repor volume perdido pelo processo de envelhecimento, recuperando os contornos e proporções da face.

A migração e proliferação de fibroblastos, a síntese de matriz extracelular (MEC) e a formação bem-sucedida de tecido de granulação são as características da fase proliferativa do processo de reparo dérmico [14]. Essas mesmas observações foram observadas na Figura 5, indicando que o processo de reparo tecidual resultou em uma cicatrização controlada nos cortes histológicos após implantação do AH. Podendo ser verdadeira a hipótese de que o ácido hialurônico estimula a produção de colágeno e elastina indiretamente através do processo inflamatório local, além de restaurar o volume tissular [15].

O bioestímulo de novas fibras de colágeno foi percebido após injeções de ácido hialurônico reticulado conforme relatos de um estudo desenvolvido nos Estados Unidos a partir onze voluntários saudáveis com idade média de 74 anos. Os resultados revelaram que em comparação aos controles, à pele que recebeu a injeção dos AH reticulado aumentou a deposição de colágeno ao redor do preenchimento. Onde se observou fatores de crescimento pró-fibróticos, e regulação procolágeno I e III positiva em 4 e 13 semanas após o tratamento. Nesse sentido, os tratamentos estéticos de preenchimento com AH reticulado estimula a síntese de colágeno, restaurando parcialmente os componentes da matriz extracelular dérmica [16].

A produção de colágeno após as injeções de ácido hialurônico reticulado ocorre porque o AH preenche o espaço entre as fibrilas de colágeno fragmentado e frouxo. Partindo-se desse princípio, o AH reticulado ao preencher o espaço aplica forças mecânicas sobre a matriz extracelular, induzindo o alongamento dos fibroblastos e a expressão gênica de colágeno, além de deposição de feixes de fibrilas colágenas maduras, frequentemente associadas a uma pele jovem [17].

Os resultados observados na Figura 6, como menor processo inflamatório e organização dos fibroblastos e fibras colágenas se deve ao efeito da terapia de fotobiomodulação, que se utiliza de laser de baixa intensidade como a luz vermelha e infravermelha com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes. Principalmente através dos seus efeitos terciários, que ocorre pela ativação de fatores de transcrição, com significativa melhora da sobrevivência celular, bem como pelo aumento da proliferação, migração e síntese de novas proteínas [18].

Conforme a Tabela 1 observa-se que o grupo CP (AH) demonstrou maior área de colágeno tipo I e III, enquanto os grupos G1, G2 e G3 revelaram valores inferiores. Talvez essas observações sejam resultado da fotobiomodulação, haja vista que essa tecnologia diminui o processo inflamatório, podendo de essa forma atuar sobre os fibroblastos, resultando em menor sinalização desta célula, o que ocorre de maneira inversa nos tecidos tratados apenas com AH.

Os mecanismos de indução de colágeno iniciam com a deposição de fibras colágenas do tipo III, com ativação dos fibroblastos e posteriormente a deposição de colágeno tipo I. Esse mecanismo ocorre de forma contínua até que haja predominância do colágeno tipo I, o qual promove melhora da espessura e qualidade pele [19,20,21]. No presente estudo, os grupos G1 e G2 revelaram maior área de colágeno tipo I, enquanto os grupos CP e G3 expuseram maior área de colágeno tipo III. Desse modo, parece que neste estudo, a terapia de fotobiomodulação associada aos LV e LIV retardou o amadurecimento das fibras do tipo III para o tipo I ou quando associadas não exercem um efeito fotobiomodulador efetivo sobre a resposta inflamatória, ou o tempo para esse tipo de análise tenha sido insuficiente (Tabela 1). Uma vez que o colágeno tipo III geralmente está associado ao tecido cicatricial ou lesão [22]. O mesmo parece ocorrer no tratamento apenas com AH, o qual pode estar mantendo o processo inflamatório mais persistente.

Estudos em modelos animais são pioneiros em avaliar os efeitos da terapia do laser vermelho e infravermelho em enxertos de pele. As discussões acerca dos resultados desses estudos revelam que o laser vermelho melhora significativamente o enxerto de pele bem como a expressão da proteína do

fator de crescimento transformador beta (TGF- β), assim como a densidade de das fibras colágenas. Sugerindo, portanto, que o laser vermelho é eficiente na expressão de proteínas relacionadas ao reparo tecidual [23]. Entretanto, no presente estudo, observou melhores resultados na deposição de colágeno a partir do laser infravermelho e quando este também foi associado ao laser vermelho.

O efeito da laserterapia de baixa potência sobre o colágeno I e III tem sido estudado a décadas mostrando diminuição significativa de células inflamatórias e aumento da deposição de colágeno em tecidos tratados. A irradiação do laser geralmente ocorre em doses de 3 e 4J/cm² [24]. Contrariamente, os resultados deste estudo revelaram que o AH promoveu maior deposição de colágeno, demonstrando que os preenchedores dérmicos de AH além de volumizar causam um efeito positivo sobre o aspecto da pele, que pode ser melhorando em longo prazo com constantes abordagens de preenchimento facial. Além disso, este estudo abre uma discussão importante no que se refere a uma afirmação hipotética de que o uso de fotobiomodulação associada aos procedimentos de preenchimento pode diminuir a biossíntese de colágeno em áreas tratados com AH, podendo ainda essa afirmação ser expandida para os bioestimuladores de colágeno.

Sendo a hipótese acima verdadeira, as terapias de fotobiomodulação passariam a ser utilizadas como terapias únicas em sessões de tratamento estético para indução de colágeno bem como em procedimentos cirúrgicos que não visam exclusivamente o bioestímulo do colágeno. Contudo, são necessários novos estudos desenvolvidos em humanos que possam negar ou afirmar esta hipótese.

Conclusão

O presente estudo aborda um efeito potencialmente favorável à produção de colágeno a partir da injeção de ácido hialurônico e o tratamento com a injeção de ácido hialurônico associado à fotobiomodulação com laser vermelho e infravermelho, ao contrário do ácido hialurônico submetido apenas terapia isolada com laser vermelho e/ou infravermelho.

Referências

1. Faivre J, Gallet M, Tremblais E, Trévidic P, Bourdon F (2021) Advanced Concepts in Rheology for the Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Soft Tissue Fillers. *Dermatol Surg* 47:e159-e167. <https://doi.org/10.1097/dss.0000000000002916>.
2. Sánchez-Carpintero I, Candelas D, Ruiz-Rodríguez R (2010) Dermal fillers: types, indications, and complications. *Actas Dermo-Sifiliogr (English Edition)* 101:381-393. [https://doi.org/10.1016/s1578-2190\(10\)70660-0](https://doi.org/10.1016/s1578-2190(10)70660-0).
3. Sadick N, Sorhaindo L. (2007) The utility of soft tissue fillers in clinical dermatology: treatment of fine wrinkles and skin defects. *Expert Rev Med Devices* 4:559-565. <https://doi.org/10.1586/17434440.4.4.559>.
4. Dai X, Li L, Peterson W, Baumgartner RR, Huang J, Baer-Zwick A, Hoeller S, Ivezic-Schoenfeld Z, Prinz M (2019) Safety and effectiveness of hyaluronic acid dermal filler in correction of moderate-to-severe nasolabial folds in Chinese subjects. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 12:57-62. <https://doi.org/10.2147/ccid.s187079>.
5. John HE, Price RD (2009) Perspectives in the selection of hyaluronic acid fillers for facial wrinkles and aging skin. *Patient Prefer Adherence* 3:225-230. <https://doi.org/10.2147/ppa.s3183>.
6. Beasley KL, Weiss MA, Weiss RA (2009) Hyaluronic acid fillers: a comprehensive review. *Facial Plast Surg* 25:86-94. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220647>.
7. Signorini M, Liew S, Sundaram H, De Bouille KL, Goodman GJ, Monheit G, Wu Y, Trindade de Almeida AR, Swift A, Braz AV (2016) Global Aesthetics Consensus: Avoidance and Management of Complications from Hyaluronic Acid Fillers- Evidence- and Opinion-Based Review and Consensus Recommendations. *Plast Reconstr Surg*. 137(6): 961e-71e. <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000002184>.
8. Funt D, Pavicic T (2013) Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6:295-316. <https://doi.org/10.2147/ccid.s50546>.
9. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H (2005) Low level laser therapy (LLL) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 1056:486-493. <https://doi.org/10.1196/annals.1352.040>.
10. Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J (1987) Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg* 18:47-50. <https://doi.org/10.1097/0000637-198701000-00011>.
11. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W (1981) Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 116:293-296. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1981.01380150021005>.
12. Mester E, Jaszszagi-Nagi E (1971) The effect of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophys* 35:227-230.
13. Rittié L, Fisher GJ (2015) Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a0155370. <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a015370>.
14. Prabhu V, Rao BSS, Rao ACK, Prasad K, Mahato KK (2022) Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice. *Lasers Med Sci* 37:171-180. <https://doi.org/10.1007%2Fs10103-020-03202-z>.
15. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, Sohail M, Ramli NA, Thu HE, Hussain Z (2018) Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol* 120:1682-1695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>.
16. Hamblin MT (2017) Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 4:337-361. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>.

17. Cui Y, Wang F, Voorhees JJ, Fisher GJ (2021) Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of Cross-linked Hyaluronic Acid. *Plast Reconstr Surg* 147:43S-49S. <https://doi.org/10.1097/prs.00000000000007620>.
18. Wang F, Garza LA, Kang S, Varani J, Orringer JS, Fisher GJ, Voorhees JJ (2007) In vivo stimulation of the new collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch Dermatol* 143:155-163. <https://doi.org/10.1001/archderm.143.2.155>.
19. Berlin AL, Hussain M, Goldberg DJ (2008) Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol Surg* 34:S64-S67. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x>.
20. Yutskovskaya Y, Kogan E, Leshunov E (2014) Randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. *J Drugs Dermatol* 13:1047-1052.
21. Cuttle L, Nataatmadja M, Fraser JF, Kempf M, Kimble RM, Hayes MT (2005) Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. *Wound Repair Regen* 13:198-204. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.130211.x>.
22. Smith RK, Birch H, Patterson-Kane J, Firth EC, Williams L, Cherdchutham W, van Weeren WR, Goodship AE (1999) Should equine athletes commence training during skeletal development?: changes in tendon matrix associated with development, ageing, function and exercise. *Equine Vet J Suppl* 30:201-209. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb05218.x>.
23. Martignago CCS, Tim CR, Assis L, Da Silva VR, Dos Santos ECB, Vieira FN, Parizotto NA, Liebano RE (2019) Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats. *Lasers Med Sci* 35:157-164. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02812-6>.
24. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior ECP, de Carvalho PTC (2014) Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci* 29:313-319. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1341-2>.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Torna-se necessário o desenvolvimento e consolidação de protocolos utilizando a fotobiomodulação nos tratamentos estéticos faciais envolvendo os preenchedores à base de ácido hialurônico, uma vez que a Harmonização Orofacial alcançou grandes avanços desde sua implantação na odontologia. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos em modelos humanos, randomizados, duplo-cego, com vista a elucidar o mecanismo real da fotobiomodulação após preenchimento facial e determinar se essa tecnologia pode contribuir ou até mesmo comprometer a deposição de colágeno e reestruturação da matriz extracelular dérmica.

4. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE

Expandir o conhecimento sobre os efeitos da injeção de ácido hialurônico na derme e a terapia de fotobiomodulação na deposição do colágeno tipo I e III para os profissionais da estética e cosmiatria facial, revolucionando os tratamentos estéticos na Harmonização facial visando desenvolver tratamentos cada vez mais efetivos e de alta evidência científica, para garantir um planejamento e tratamento estético previsível e seguro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.R. T.; SALIBA, A. F. N. Hyaluronidase in cosmiatry: what should we know? **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 197-204, 2015.

AMAT, A. *et al.* The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 2, p. 152-160, 2006.

BRODY, H. J. Use of hyaluronidase in the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions or unwanted hyaluronic acid misplacement. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 8-1, p. 893-897, 2005.

CASSUTO, D.; SUNDARAM, H. A problem-oriented approach to nodular complications from hyaluronic acid and calcium hydroxylapatite fillers: Classification and recommendations for treatment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 132, n. 4-2, p. 48S-58S, 2013.

DUNN, A. L. *et al.* Hyaluronidase: A review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 1, p. 127-131, 2010.

GUTMANN, I. E.; DUTRA, R. T. Reações adversas associadas ao uso de preenchedores faciais com ácido hialurônico. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 11, n. 20, p. 7-17, 2018.

JONES, D. *et al.* In vitro resistance to degradation of hyaluronic acid dermal fillers by ovine testicular hyaluronidase. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. S1, p. 804-809, 2010.

JUNKINS-HOPKINS, J. M. Filler complications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 4, p. 703-705, 2010.

LEE, A. *et al.* Hyaluronidase. **Dermatologic Surgery**, v. 36, n. 7, p. 1071-1077, 2010.

NERI, S. R. N. G. *et al.* The use of hyaluronidase in complications caused by hyaluronic acid for volumization of the face: a case report. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 4, p. 364-366, 2013.

PIVA, J. A. A. C. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 947-954, 2011.

RABELO, S. B. *et al.* Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 474-479, 2006.

RZANY, B. *et al.* Hyaluronidase in the correction of hyaluronic acid-based fillers: a review and recommendation for use. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 317-323, 2009.

VLADIMIROV, Y. A. *et al.* Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

WOHLRAB, J. *et al.* Clinical trial for safety evaluation of hyaluronidase as diffusion enhancing adjuvant for infiltration analgesia of skin with lidocaine. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 1, p. 91-96, 2012.