

**AValiação da Terapia Fotodinâmica Mediada por Azul de Metileno  
na Cicatrização: Estudo Experimental In Vivo*****EVALUATION OF METHYLENE BLUE MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY IN  
WOUND HEALING: IN VIVO EXPERIMENTAL STUDY*****Erick Souza Neri<sup>1</sup> \* Charton Frankson Madureira Nascimento Júnior<sup>2</sup> \* Taynara Camille  
Guilherme Lima<sup>3</sup> \* Rafael Pires Moreira<sup>4</sup> \* Ana Rita Pinheiro Barcessat<sup>5</sup>****RESUMO**

**Objetivo:** Avaliar os efeitos tissulares de uma única aplicação da Terapia Fotodinâmica em lesões induzidas em modelos experimentais, determinando sua influência na formação colagênica e na duração do ciclo celular. **Método:** Cinquenta lesões induzidas em camundongos Mus Musculus foram randomicamente tratadas com Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno a 0,01% ativado por Laser vermelho 660 nm (G1), Laserterapia sem fotossensibilizador (G2), Azul de Metileno a 0,01% (G3), Pomada dermatológica como controle positivo (G4) e água destilada como controle negativo (G5), sendo avaliados histologicamente quanto à deposição colagênica e áreas de organização nucleolar após 72 horas do tratamento. **Resultados:** Os grupos fotoativados apresentaram diferença significativa quanto à deposição colagênica ( $p < 0,05$ ) pela coloração de Tricrômio de Masson, demonstrando evidências de redução do tempo de reparo. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pela técnica AgNOR nas regiões organizadoras nucleolares. **Conclusões:** A Terapia Fotodinâmica e a fotobiomodulação por Laser apresentaram evidência de deposição colagênica já nas primeiras horas do processo de cicatrização, sem necessariamente alterar a duração do ciclo celular local, não exercendo aceleração no processo de proliferação celular nas condições experimentais avaliadas neste estudo.

**Palavras-chave:** Fototerapia; Fotoquimioterapia; Azul de Metileno; Cicatrização; Ferimentos e Lesões.

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the tissue effects of a single application of Photodynamic Therapy on lesions induced in experimental models, determining their influence on collagen formation and cell cycle duration. **Method:** Fifty lesions induced in Mus Musculus mice were randomly treated with 0.01% Methylene Blue mediated Photodynamic Therapy activated by 660 nm Red Laser (G1), Lasertherapy without photosensitizer (G2), 0.01% Methylene Blue (G3), Dermatological Ointment as positive control (G4) and Distilled Water as negative control (G5), being histologically evaluated for collagen deposition and areas of nucleolar organization after 72 hours of treatment. **Results:** The photoactivated groups showed a significant difference regarding collagen deposition ( $p < 0,05$ ) by the Massons Trichrome Stain, showing evidence of reduced repair time. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) by the AgNOR technique in the nucleolar organizer regions. **Conclusions:** Photodynamic Therapy and Laser Photobiomodulation showed evidence of collagen deposition in the first hours of the healing process, without necessarily changing the duration of the local cell cycle, not exerting acceleration in the cell proliferation process under the experimental conditions evaluated in this study.

**Keywords:** Phototherapy; Photochemotherapy; Methylene Blue; Wound Healing; Wounds and Injuries.

<sup>1</sup> Enfermeiro. Pós-graduando em Enfermagem do Trabalho. Universidade Federal do Amapá Macapá - AP - Brasil ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1754-1212> E-mail: erickneri13@gmail.com

<sup>2</sup> Enfermeiro. Universidade Federal do Amapá Macapá - AP - Brasil ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5406-8102> E-mail: chartonjr99@gmail.com

<sup>3</sup> Enfermeira. Mestranda em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Amapá Macapá - AP - Brasil ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6170-9609> E-mail: taycami43@gmail.com

<sup>4</sup> Doutorando em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá Macapá - AP - Brasil ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2236-5145> E-mail: hosktoff@hotmail.com

<sup>5</sup> Odontóloga. Doutora em Estomatologia Básica e Aplicada. Universidade Federal do Amapá Macapá - AP - Brasil ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5261-6435> E-mail: ritabarcessat@gmail.com



## INTRODUÇÃO

A cicatrização consiste em um processo complexo de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que visam obter a reparação tecidual, e independente do agente responsável pela perda de integridade tecidual, pesquisas com inovações que facilitem a cicatrização são de interesse em diferentes modalidades clínicas e cirúrgicas, especialmente considerando o número crescente de casos que necessitam de cuidados especiais, como obesidade, doenças crônicas de base, estado nutricional, imunológico e vascular, que podem eventualmente interferir no microambiente tecidual.<sup>(1)</sup>

Considerando o impacto social e econômico de feridas crônicas nos sistemas de saúde, especialmente no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), e seus impactos na vida dos indivíduos acometidos, como reduções na qualidade de vida e desfechos graves como amputações e morte, bem como impacto na saúde pública e assistência à saúde como a multirresistência a antimicrobianos <sup>(2)</sup>, é necessário repensar em alternativas de baixo-custo e com benefícios a curto e longo prazo para o manejo dessas lesões.

Didaticamente, a partir do momento em que ocorre uma lesão no corpo humano, inicia-se uma ação coordenada de três eventos-chave para o processo cicatricial: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de

remodelamento. Tais eventos dependem crucialmente das funções do fibroblasto, célula que exerce um importante papel na manutenção da Matriz Extracelular (MEC) conjuntiva, sintetizando elementos como fibronectina, proteases, glicosaminoglicanos, elastina e principalmente o colágeno <sup>(1,3)</sup>. De tal modo, a proliferação fibroblástica e a deposição de colágeno configuram-se como indicadores importantes em estudos de cicatrização.

As Regiões Organizadoras de Nucléolos, do inglês *nucleolar organizer regions* (NOR), são estruturas localizadas no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, compostas por proteínas ácidas argirofílicas. São úteis como ferramenta de investigação de proliferação celular, uma vez que as NOR desempenham papel na transcrição do RNA ribossômico, associadas à síntese protéica necessária na proliferação durante a interfase do ciclo celular.<sup>(3,4)</sup> Enquanto a deposição colagênica pode ser evidenciada por combinações de corantes que permitem visualizar e diferenciar fibras de colágeno a partir da interação dos corantes com as proteínas da MEC.

A Terapia Fotodinâmica (TFD), do inglês *Photodynamic therapy* (PDT) tem se destacado como uma alternativa terapêutica promissora por promover danos à membrana da célula-alvo através da interação entre uma fonte de luz, um fotossensibilizador (FS)

associados ao oxigênio tecidual, gerando uma reação fotoquímica que promove a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, o oxigênio singlete e outras espécies reativas que apresentam efeitos citotóxicos.<sup>(6-8)</sup>

A TFD exerce efeitos positivos descritos na literatura contra células tumorais e amplo efeito antimicrobiano contra bactérias, fungos, vírus e protozoários, além de ser um método de baixo custo, ausente de efeitos adversos e não apresentar até o momento risco para o desenvolvimento de resistência microbiana.<sup>(7,8)</sup> Entretanto, ainda não está claro se além da ação descontaminante, a TFD poderia exercer algum benefício através de efeitos diretos em processos cicatriciais, interferindo no ciclo celular e/ou na MEC.

Visando contribuir nas evidências dessa intervenção como uma potencial terapêutica no manejo clínico de lesões, especialmente feridas complexas com ou sem contaminação, tanto em ambiente ambulatorial quanto hospitalar, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos tissulares de uma única aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador Azul de Metileno, durante o período inicial do processo de reparo tecidual em modelo experimental *in vivo*.

## MÉTODOS

### Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo parecer nº 005/2015 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo realizado entre agosto de 2016 e julho de 2017 no Laboratório de Estudos Morfofisiológicos e Parasitários (LEMP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), obedecendo os princípios éticos de experimentação animal, conforme normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### Grupos experimentais

Trata-se de um estudo experimental, realizado a partir de lesões cutâneas induzidas em 25 camundongos da espécie *Mus musculus*, família Muridae, raça Swiss, cedidos pelo biotério do Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal do Amapá, alocados e distribuídos de forma randomizada em 5 grupos de 5 animais cada. Foram realizadas duas lesões em cada animal e cada lesão recebeu um tratamento diferente, totalizando 50 lesões. Os camundongos foram acondicionados em gaiolas individuais, com alimentação e hidratação a vontade, e submetidos a controle de ciclos claro e escuro, controle de temperatura e ruídos.

Os grupos experimentais foram: 1) TFD: lesões tratadas com aplicação prévia de Azul de Metileno (AM) a 0,01% (Chimiolux<sup>®</sup> DMC, Brasil) por 5 minutos, seguido da irradiação de laser vermelho; 2) Laser: tratado somente com irradiação de laser vermelho 3) AM a 0,01% (Chimiolux<sup>®</sup>

DMC, Brasil) seguida de remoção de excesso após 5 minutos. Os grupos controles foram: 4) Controle positivo: tratado com Pomada Dermatológica (PD), uma aplicação por 5 minutos, seguida da remoção de excesso; 5) Controle negativo: tratado somente com Água Destilada (AD).

### **Indução das lesões e Eutanásia**

Os camundongos foram posicionados em decúbito ventral para a realização da tricotomia no dorso com cortador de cabelo Oasis® OS-704 e assepsia local com álcool a 70%. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com Cloridrato de Quetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (10 mg/kg), administrados via intraperitoneal, em seringas de insulina de 100UI com agulha descartável (13x4,5).

Para realizar as lesões, utilizou-se o instrumento Punch Dermatológico Descartável - Paramount Blades, ponta ativa redonda com dimensões 6x6x3 mm, obedecendo uma distância mínima de 2cm entre cada ferida. Posteriormente foram avaliadas as medidas da lesão por meio de um paquímetro (medidas lineares) e por sonda milimetrada (medida da profundidade).

As lesões induzidas foram tratadas obedecendo os seguintes parâmetros de laser vermelho: a) Comprimento de onda - $\lambda$ -: 660 nm; b) Potência: 40 mW; c) Energia: 3,6 J/ponto; d) Densidade de energia por ponto: 90 J/cm<sup>2</sup>; e) Área do ponto: 0,04 cm<sup>2</sup>; f)

Tempo por ponto: 1,5 min; g) Número de irradiações: 01; h) Número de pontos irradiados: 02; i) Densidade de potência: 1000 mW/cm<sup>2</sup>.<sup>(7,9)</sup>

Após 72 horas do tratamento das lesões, realizou-se a eutanásia dos animais por meio de superdosagem anestésica, observando-se o nível de profundidade de sedação: redução drástica dos reflexos autonômicos da cauda, córnea e pálpebra, e perda de consciência do animal. Para coletar o material para a análise histológica, realizou-se a secção longitudinal do dorso necropsiado, seguido de fixação em paraformaldeído a 20% em solução tampão de fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (anidro) de pH neutro, preparado com 24 horas de antecedência.

### **Processamento histológico e colorações especiais**

As amostras foram fixadas por 24 horas e seccionadas no plano mediano para inclusão em parafina, seguida da imersão em por 10 minutos em solução tampão de formol por duas vezes, a seguir procedeu-se a desidratação dos tecidos por imersão em banho em cadeia crescente de etanol, iniciando com etanol a 30% por 10 minutos, até atingir o banho com etanol absoluto. Posteriormente, realizou-se banho com etanol/xilol a 50%, seguidos de dois banhos em xilol e por fim a imersão em parafina com ponto de fusão em 60° C, para confecção dos blocos histológicos.

Neste estudo, para a avaliação da proliferação celular foram realizados 3 cortes de 5µm para cada amostra estendidos em lâminas de vidro lisas, onde aplicou-se a técnica de Regiões Argirofílicas Organizadoras Nucleolares (AgNOR) modificada proposta por Ploton e colaboradores<sup>(10)</sup>, que permite a visualização seletiva das NOR através da impregnação por prata coloidal, sendo possível observá-las na microscopia de luz como estruturas arredondadas na cor preta ou marrom-café.  
(10,11)

A técnica AgNOR consiste em desparafinização em xilol seguida de desidratação em banhos sucessivos de álcool e solução de ácido acético/álcool e banho em água corrente por 5 minutos. As amostras receberam solução de prata a 50 % e gelatina 1%, e submetidas a 45°C em estufa por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente deionizada a 40°C, seguida de novas imersões em soluções crescentes de álcool para desidratação e receberam lamínula em meio de montagem bálsamo do Canadá.

Para avaliação da deposição de colágeno, outros 3 cortes de cada amostra foram desparafinizados e hidratados, lavados em água corrente deionizada por 5 minutos e colocadas em solução de Bouin em estufa a 60°C durante 60 minutos para iniciar a etapa de coloração especial de Tricrômio de Masson (TM), permitindo demarcar em

verde-azulado as áreas de deposição colagênica.<sup>(12,13)</sup>

Após a lavagem em água corrente e lavagem em água destilada, as amostras foram coradas com Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos seguida de uma nova lavagem em água corrente deionizada por mais 10 minutos, seguida da submissão em solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos, e em seguida submetidas em água destilada equilibrada em solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 15 minutos.

Por fim, a coloração por Azul de Anilina foi realizada durante 10 minutos, e posteriormente lavados em água destilada para submeter as amostras em solução de Ácido Acético Glacial 1% durante 5 minutos. Após essa etapa, realizou-se desidratação em cadeia crescente de álcool, para diafanizar e montar as lâminas com lamínula e meio de montagem. Posteriormente, os blocos foram encaminhados para a análise histopatológica, realizada por um pesquisador alheio ao estudo.

Para análise considerou-se como padrão a área de 36 mm<sup>2</sup> de cada lesão, sendo expressos em aproximadamente 49984 pixels/cm a partir da demarcação pelo *Software Image J*. As contagens das NOR foram evidenciadas em magnificação de 400x, e as áreas de deposição colagênica na coloração azulada pela coloração Tricrômio de Masson foram evidenciadas na



magnificação de 10x, fornecendo melhor contrastação dos demais elementos teciduais como citoplasmas, queratina e fibras intercelulares.

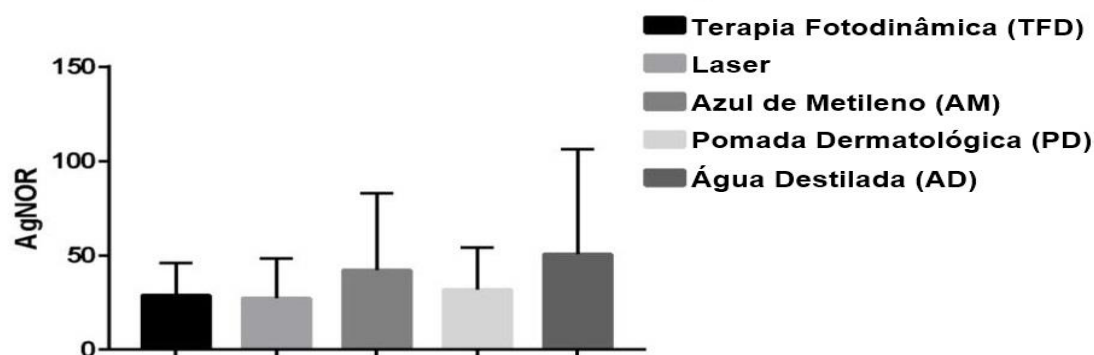
Ao final, foi feita a média aritmética simples das áreas coradas pelo Tricrômio de Masson para determinar a presença de fibras de colágeno em cada grupo, e em seguida foram realizadas comparações múltiplas e para análises dois-a-dois por meio do teste One-way ANOVA. Para a coloração de AgNOR, considerou-se as médias dos valores de quantificação de NOR por área, e

submetidas a comparações múltiplas e análises dois-a-dois também por meio do teste One-way ANOVA.

## RESULTADOS

Com base nos dados obtidos, observou-se pela análise estatística que média de pontos de NOR avaliados nos diferentes grupos experimentais aplicados neste estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (ANOVA  $p > 0,05$ ), conforme apresentado na figura 1.

**Figura 1** - Média de pontos de NOR por grupo experimental (ANOVA  $p > 0,05$ ). Análise dois-a-dois: Laser x Terapia Fotodinâmica ( $p > 0,05$ ) Laser x Água Destilada ( $p < 0,05$ ) Azul de Metileno x Pomada Dermatológica ( $p > 0,05$ ) Azul de Metileno x Água Destilada ( $p > 0,05$ ) Terapia Fotodinâmica x Água Destilada ( $p < 0,05$ ) Laser x Pomada Dermatológica ( $p < 0,05$ ).

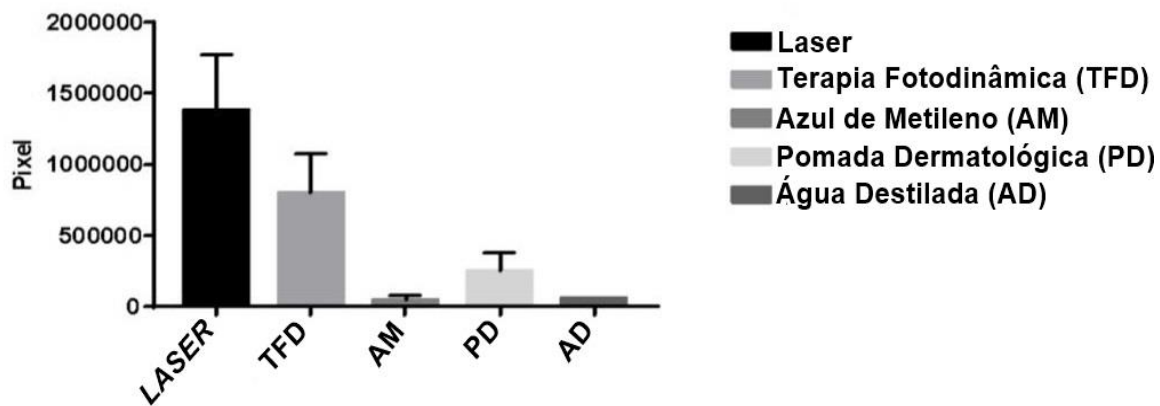


Fonte: Resultados da pesquisa.

Os tratamentos propostos avaliados pela coloração de AgNOR foram equivalentes na análise estatística, indicando que a TFD não interferiu reduzindo o tempo de ciclo celular. Entretanto, os grupos fotoativados (Laser e TFD) avaliados quanto à deposição

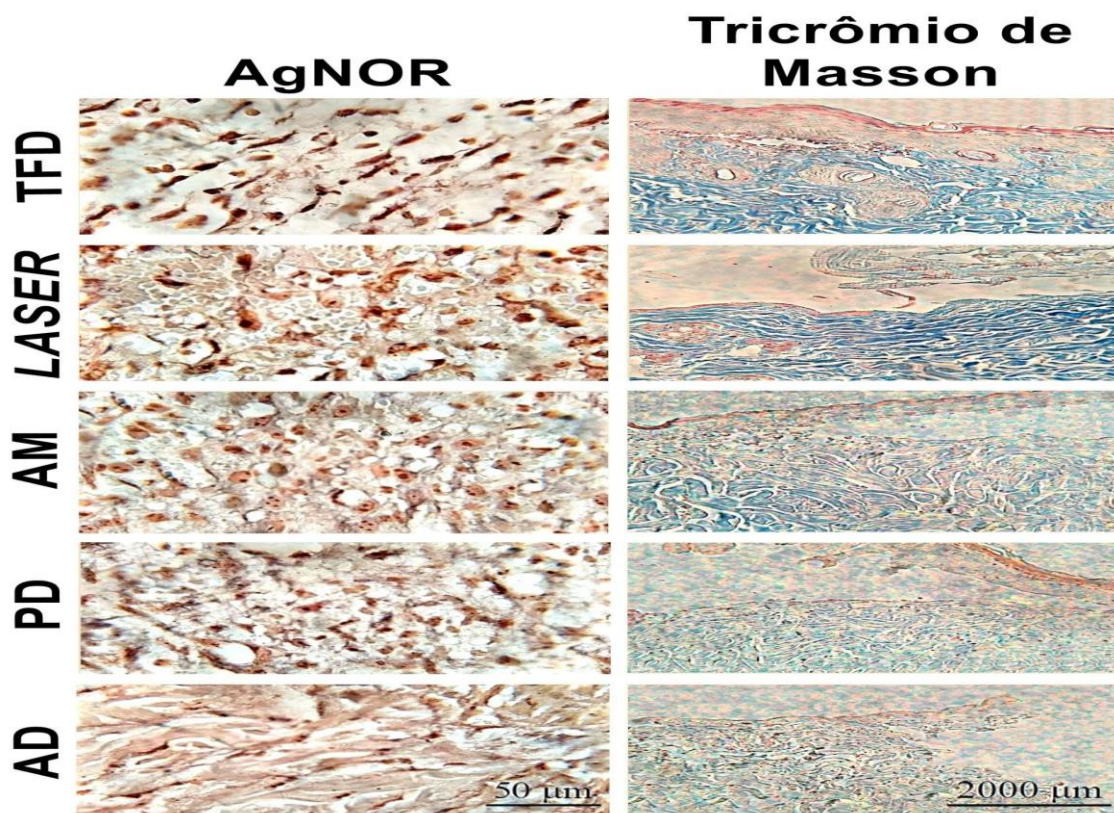
de colágeno pela coloração TM, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos demais grupos (AM, PD e AD), se destacando entre os grupos experimentais, conforme dados apresentados nas figuras 2 e 3.

**Figura 2** - Média de Pixels por área de marcação do Tricrômio de Masson por grupo experimental (ANOVA  $p < 0,05$ ). Análise dois-a-dois: Laser x TFD ( $p < 0,05$ ) Laser x AD ( $p < 0,05$ ) AM x PD ( $p > 0,05$ ) AM x AD ( $p > 0,05$ ) TFD x AD ( $p < 0,05$ ) Laser x PD ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Resultados da pesquisa.

**Figura 3** - Fotomicrografia da coloração por técnica de AgNOR e Tricrômio de Masson por grupo experimental. Observa-se pontos de NOR como estruturas intracelulares arredondadas na cor preta/marrom-café, e moderada marcação de colágeno pela mancha de Tricrômio de Masson na cor azul. TFD: Terapia fotodinâmica AM: Azul de metileno PD: Pomada dermatológica AD: Água destilada. Objetiva de Masson 10x e Objetiva de AgNOR 400x.



Fonte: Resultados da pesquisa.

Nas condições experimentais deste estudo, observa-se quanto ao padrão de

marcação da técnica de AgNOR uma marcação equivalente na intensidade e

localização, majoritariamente em fibroblastos, evidenciado mais no tecido conjuntivo quando comparado com o tecido epitelial.

## DISCUSSÃO

A fase de proliferação se intensifica simultaneamente com uma resposta imunológica local atenuada dentro de 48 até 96 horas<sup>(3-4)</sup> após ocorrer a lesão, justificando a coleta das amostras com 72 horas de tratamento. O grupo Laser não apresentou diferença estatisticamente significativa dos demais grupos em relação à duração de ciclo celular pela técnica de AgNOR ( $p>0,05$ ).

Entretanto, foram observadas pela coloração TM uma área de deposição colagênica significativamente diferente ( $p<0,05$ ) quando comparados aos demais grupos (AM, PD e AD), vale considerar que o tempo experimental é de 72 horas majoritariamente se está diante de fenômenos celulares e vasculares da fase inflamatória do reparo, no entanto evidenciam -se áreas de deposição significativas, corroborando com evidências de estudos.<sup>(14,15)</sup> demonstrando que o *Laser* acelera a reparação tecidual, estimulando a proliferação e diferenciação fibroblástica, aumentando a síntese e deposição de colágeno, deste modo, enfatizamos os efeitos positivos do Laser em lesões cutâneas no que tange à deposição colagênica, porém sem interferência em ciclo celular.

A TFD mediada por AM foi avaliada nos estudos de Silva et al.<sup>(16)</sup> que observaram redução da proliferação celular e da deposição colagênica, e o aumento da atividade apoptótica e neovascularização, Lamarque et al.<sup>(17)</sup> evidenciaram efeito citotóxico em fibroblastos, ativando genes apoptóticos devido ao fotodano mitocondrial, e Heckenkamp et al.<sup>(18)</sup> observaram *in vitro* uma redução de 30% na proliferação e 47% na migração de fibroblastos com 72 horas de tratamento, e redução dos níveis de fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Corroborado por esses estudos, é possível descartar possíveis efeitos proliferativos da TFD nas lesões induzidas neste trabalho.

Carneiro et al.<sup>(19)</sup> e Sperandio et al.<sup>(20)</sup> mostraram que com 72 horas de tratamento, as lesões induzidas em ratos tratadas com *Laser* e TFD apresentaram crostas mais espessas, intensificaram a presença de tecido de granulação, evidenciaram moderada deposição de colágeno e repitelização estatisticamente diferenciada, comparada aos demais grupos. Garcia et al.<sup>(21)</sup> e Rudenko et al.<sup>(22)</sup> reforçam que a TFD interfere positivamente na cicatrização nos estágios iniciais de reparo, acelerando a inflamação e aumentando a deposição de colágeno, corroborando com os achados deste estudo.

Algumas revisões sistemáticas<sup>(23-25)</sup> e estudos clínicos como o de Moura e



colaboradores<sup>(7)</sup> Nunes et al.<sup>(8)</sup> e Aspiroz et al.<sup>(26)</sup> demonstraram a eficácia da TFD no tratamento de lesões, com melhoras significativas na cicatrização comparadas com grupos controles. Entretanto, é válido considerar a advertência de Deyhimi et al.<sup>(27)</sup> que a TFD usada no tratamento de feridas inibiria progressivamente a proliferação ou a viabilidade celular, o que não se pôde observar nas fases iniciais de reparo, aqui avaliadas.

Sabe-se que a MEC exerce várias funções regulatórias sobre a função e viabilidade dos fibroblastos, por meio de sinais parácrinos, citocinas e fatores de crescimento,<sup>(3,28)</sup> de tal modo, Pazos e colaboradores<sup>(29)</sup> demonstraram que, além dos efeitos no tecido-alvo, a TFD modula a MEC, exercendo diversas alterações moleculares. Tedesco e Jesus<sup>(30)</sup> enfatizam que alterações na MEC podem ativar quinases reguladas por sinalização extracelular, exercendo efeitos fotobiomoduladores que intensificam a proliferação celular. No presente estudo, foram observadas alterações histológicas importantes para os grupos fotoativados (TFD e Laser), mesmo não sendo estatisticamente significativas dentro de 72 horas de tratamento.

Com base nos dados apresentados, propomos como hipótese que a TFD gerou modulação tecidual a partir da geração das EROs, desencadeando sinais parácrinos locais que levaram à ativação de fibrócitos

adjacentes à lesão, estimulando um estado metabolicamente ativo dessas células e conseqüentemente um efeito fotobiomodulador secundário da TFD, proporcionando maior síntese e deposição de fibras de colágeno avaliadas através da coloração TM.

## CONCLUSÕES

A Terapia Fotodinâmica avaliada por meio da coloração de AgNOR não demonstrou efeito sobre o ciclo celular nas condições experimentais aplicadas neste estudo, apresentando efeito similar aos outros grupos no padrão de distribuição das Regiões Organizadoras de Nucléolos. Entretanto, feridas tratadas com Terapia Fotodinâmica, bem como aquelas tratadas com fotobiomodulação por Laser apresentaram evidências histológicas com potenciais benefícios na redução do tempo de reparo, demonstrando deposição colagênica aumentada no tempo de 72 horas após o início do tratamento. Entretanto, ressalta-se a necessidade mais estudos que visem esclarecer os mecanismos moleculares e histológicos subjacentes da Terapia Fotodinâmica no reparo de lesões.

## REFERÊNCIAS

1. Hess CT. Checklist for factors affecting wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2011; 24(4): 192.
2. Sen CK. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium

- of Estimates. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2021; 10(5): 281-292.
3. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-20. Review.
  4. Zanata A, Busin CS, Silva SO, Linden MS, Trentin MS, Carli JP. Avaliação da atividade proliferativa celular da leucoplasia bucal por meio do método AgNOR. *RFO Passo Fundo*. 2015;20(1):17-22.
  5. Oshima CT, Forones NM. AgNOR em câncer gástrico. *Arq Gastroenterol*. 2001;38(2):89-93.
  6. Barcessat AR, Corrêa L. Mecanismos. In: Barcessat AR, Corrêa L, editor. *Terapia Fotodinâmica Oncológica: considerações sobre morte e proliferação celular*. São Paulo: Novas Edições Acadêmicas; 2017. p. 12-17.
  7. Moura JP, Brandão LB, Barcessat AR. Estudo da Terapia Fotodinâmica (PDT) no reparo de lesões teciduais: estudo de casos clínicos. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2018;8(1):103-10.
  8. Nunes CS, Junior Proietti AA, Barcessat AR. Descontaminação fotoquímica de alvéolos dentários em técnicas distintas de Terapia Fotodinâmica: relato de dois casos clínicos. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2018;8(2):129-37.
  9. Barcessat AR, Huang I, Rosin FP, dos Santos Pinto D Jr, Maria Zezell D, Corrêa L. Effect of topical 5-ALA mediated photodynamic therapy on proliferation index of keratinocytes in 4-NQO-induced potentially malignant oral lesions. *J Photochem Photobiol B*. 2013;126:33-41.
  10. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *J Mol Histol*, 1986; 18(1): 5–14.
  11. Filippin C, Chistofolletti LD, Ribeiro MC, Vituri CL. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. *RBAC*. 2006;38(3):133-9.
  12. Suvik A, Effendy AW. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malays J Vet Res*. 2012;3(1):39-47.
  13. Campos EP, Brandi AJ, Massignani AM, Baptista N, Arminante JC. Modificação do método tricrômio de masson para coloração de tecidos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1976;35/36(único):77-80.
  14. Kara N, Selamet H, Benkli YA, Beldüz M, Gökmenoğlu C, Kara C. Laser Therapy Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Fibroblast Cells. *Wounds*. 2020;32(3):69-73.
  15. Ma H, Yang JP, Tan RK, Lee HW, Han SK. Effect of low-level laser therapy on proliferation and collagen synthesis of human fibroblasts in Vitro. *JWMMR*. 2018;14(1):1-6.
  16. Silva AP, Neves CL, Silva EA, Lima Portela TC, Iunes RS, Cogliati B, et al. Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;23:154-64.
  17. Lamarque GC, Cusicanqui Méndez DA, Arruda Matos A, José Dionísio T, Machado MA, Magalhães AC, et al. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy



- in fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101654.
18. Heckenkamp J, Aleksic M, Gawenda M, Breuer S, Brabender J, Mahdavi A, et al. Modulation of human adventitial fibroblast function by photodynamic therapy of collagen matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;28(6):651-9.
  19. Carneiro VS, Catão MH, Menezes RF, Araújo NC, Gerbi ME. Methylene blue photodynamic therapy in rats' wound healing: 21 days follow-up. *Biophotonics South America.* 2015; 9531:95311S.
  20. Sperandio FF, Simões A, Aranha AC, Corrêa L, Orsini Machado de Sousa, SC. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(5):581-7.
  21. Garcia VG, de Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Júnior EC, Fernandes LA, et al. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;25(2):221-8.
  22. Rudenko TG, Shekhter AB, Guller AE, Aksenova NA, Glagolev NN, Ivanov AV, et al. Specific features of early stage of the wound healing process occurring against the background of photodynamic therapy using Fotoditazin photosensitizer–amphiphilic polymer complexes. *Photochem Photobiol.* 2014;90(6):1413-22.
  23. Oyama J, Fernandes Herculano Ramos-Milaré AC, Lopes Lera-Nonose DS, Nesi-Reis V, Galhardo Demarchi I, Alessi Aristides SM, et al. Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;30:101682.
  24. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DS, Oyama J, Silva-Lalucci MP, Demarchi IG, Aristides SM, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:294-305. Review.
  25. Sun Y, Ogawa R, Xiao BH, Feng YX, Wu Y, Chen LH, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in skin wound healing: A systematic review of animal studies. *Int Wound J.* 2019;17(2):285-99.
  26. Aspiroz C, Sevil M, Toyas C, Gilaberte Y. Photodynamic Therapy With Methylene Blue for Skin Ulcers Infected With *Pseudomonas aeruginosa* and *Fusarium* spp. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108(6):e45-e48. English, Spanish.
  27. Deyhimi P, Khademi H, Birang R, Akhoondzadeh M. Histological evaluation of wound healing process after photodynamic therapy of rat oral mucosal ulcer. *J Dent (Shiraz).* 2016;17(1):43-8.
  28. Tracy LE, Minasian RA, Catterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(3):119-36. Review.
  29. Pazos MC, Nader HB. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(8):1025-35.
  30. Tedesco A, Jesus P. Low level energy photodynamic therapy for skin processes and regeneration. In: Tanaka Y, editor. *Photomedicine: Advances in Clinical Practice.* Rijeka: InTech; 2017. p. 75-94.



**Fomento e Agradecimento:**

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPq – Edital 003/2018 DPQ/PROPESPG/UNIFAP

**Autor correspondente:**

Erick Souza Neri  
Avenida Itália, 243 - Loteamento Jardim Europa - CEP: 68906-174 - +55 (96) 98415-8494 erickneri13@gmail.com

**Submissão:** 2021-09-27

**Aprovado:** 2021-11-23