






Registered Report



Journals  
**BAHIANA**  
SCHOOL OF MEDICINE AND PUBLIC HEALTH

## Avaliação histomorfométrica de feridas cutâneas de ratos submetidas a terapias biomoduladoras – protocolo de pesquisa

### Histomorphometric evaluation of skin wounds in rats submitted to biomodulatory therapies – research protocol

Flávia Quadros Lima<sup>1</sup>   
Antônio Márcio Marchionni<sup>2</sup>   
Alena Peixoto Medrado<sup>3</sup> 

<sup>1,2</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brasil. flaviaquadros.pos@bahiana.edu.br, marchionni@uol.com.br

<sup>3</sup>Autor para correspondência. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brasil. apmedrado@bahiana.edu.br

**RESUMO | INTRODUÇÃO:** A utilização de terapias biomoduladoras no intuito de auxiliar o reparo tecidual tem sido cada vez mais comum nas diversas áreas de saúde. **OBJETIVO:** Este estudo objetiva avaliar, comparativamente, os efeitos da fotobiomodulação laser de 660 nm, ozonioterapia e óleo ozonizado sobre o reparo através da análise histomorfométrica em feridas cutâneas de ratos. Serão utilizados 40 ratos Wistar distribuídos em 4 grupos de 10 animais cada, Grupo controle (GC), Laser (GL), Gás Ozônio (GGO) e Óleo Ozonizado (GOO). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Serão realizados ferimentos cutâneos padronizados no dorso dos animais e os diferentes grupos experimentais serão tratados com as terapias biomoduladoras descritas, por três dias consecutivos. Cinco e 10 dias após a realização da cirurgia, 5 ratos de cada grupo serão eutanasiados. Serão removidos fragmentos de pele, incluindo a área da ferida, para processamento histológico e posterior coloração das secções histológicas com Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho. Serão obtidas micrografias das secções histológicas e dez imagens padrão serão capturadas para avaliação quantitativa das variáveis: área de colágeno, número de vasos sanguíneos e espessura do epitélio. As variáveis infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e monomorfonucleares, assim como edema, serão analisadas semiquantitativamente. Será realizada análise estatística das variáveis do estudo, com nível de significância  $p < 0,05$ . **CONCLUSÃO:** Espera-se verificar qual das terapias biomoduladoras utilizadas pode favorecer a resolução do reparo tecidual, em especial, por promover a biossíntese do colágeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cicatrização de feridas. Terapia de luz de baixo nível. Ozônio. Ratos Wistar

**ABSTRACT | INTRODUCTION:** The use of biomodulatory therapies in order to help tissue repair has been increasingly common in different areas of health. **OBJECTIVE:** This study aims to comparatively evaluate the effects of 660 nm laser photobiomodulation, ozone therapy, and ozonized oil on repair through histomorphometric analysis in skin wounds in rats. Forty Wistar rats will be divided into 4 groups of 10 animals each, Control Group (CG), Laser Group (LG), Ozone Gas Group (OGG), and Ozonated Oil Group (OOG). **MATERIALS AND METHODS:** Standard skin wounds will be made on the back of the animals, and the different experimental groups will be treated with the biomodulatory therapies described for three consecutive days. Five and ten days after surgery, five rats from each group will be euthanized. Skin fragments, including the wound area, will be removed for histological processing and subsequent staining of histological sections with Hematoxylin-eosin and Sirius red. Micrographs of the histological sections will be obtained and ten standard images will be captured for quantitative evaluation of the variables collagen area, number of blood vessels, and epithelium thickness. The variables infiltrate of polymorphonuclear and monomorphonuclear inflammatory cells, as well as edema, will be analyzed semiquantitatively. Statistical analysis of the study variables will be performed, with a significance level of  $p < 0.05$ . **CONCLUSION:** It is expected to verify which of the biomodulatory therapies used can favor the resolution of tissue repair, in particular, by promoting collagen biosynthesis.

**KEYWORDS:** Wound healing. Low-Level Light Therapy. Ozone. Wistar, Rats.

Submetido 10/09/2021, Aceito 25/01/2023, Publicado 13/03/2023

J. Evid-Based Healthc., Salvador, 2023;5:e4105

<http://dx.doi.org/10.17267/2675-021Xevidence.2023.e4105>

ISSN: 2675-021X

Editora responsável: Ana Marice Ladeia

*Como citar este artigo:* Lima FQ, Marchionni AM, Medrado AP. Avaliação histomorfométrica de feridas cutâneas de ratos submetidas a terapias biomoduladoras – protocolo de pesquisa. J Evid-Based Healthc. 2023;5:e4105. <http://dx.doi.org/10.17267/2675-021Xevidence.2023.e4105>



## Introdução

Atualmente, diversas ferramentas terapêuticas denominadas como terapias biomoduladoras tem sido empregadas com vistas à otimização do processo cicatricial. Dentre elas, pode-se citar a acupuntura, o uso de óleos essenciais, a ozonioterapia, a fotobiomodulação com laser e diodo emissor de luz (LED) e o jato de plasma. De uma forma geral, tais terapias são capazes de promover efeitos anti-inflamatórios e analgésicos significativos, além de biomodular diferentes fases do reparo tecidual, sem gerar efeitos deletérios ao paciente.<sup>1,2</sup>

Tem sido documentado que a fotobiomodulação laser, com comprimento de onda que se situa no espectro de luz visível, pode interferir positivamente no processo cicatricial<sup>3</sup>, através do aumento da biossíntese de ATP, incremento da microcirculação<sup>4</sup> e aumento da biossíntese de colágeno por parte dos fibroblastos.<sup>5-7</sup> Tais efeitos são interdependentes do tipo do tecido tratado, da densidade de energia e de potência do laser, do tempo e intervalos de aplicação delineados para o paciente.<sup>8</sup>

O ozônio é um tipo de gás abundante na natureza, cuja molécula é composta por três átomos de oxigênio. É um gás instável que participa nas reações de oxidação-redução que ocorrem nas células.<sup>9</sup> A decomposição do ozônio em O<sub>2</sub> e um átomo livre de oxigênio é conhecida como ozonólise e é responsável pela geração de radicais livres, também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs).<sup>10,11</sup> A ozonioterapia possui documentada ação terapêutica, através de suas diferentes vias de administração<sup>12</sup>, sobre os tecidos de animais<sup>13</sup> e seres humanos<sup>14</sup> alicerçada na ativação dos mecanismos de síntese proteica, resultantes do aumento da quantidade de ribossomos e do potencial hidrogeniônico da cadeia respiratória mitocondrial. Essas mudanças no nível celular explicam a elevação da atividade funcional e o maior potencial de regeneração de tecidos e órgãos.<sup>15,16</sup>

O reparo tecidual é um evento biológico altamente dinâmico e complexo, caracterizado pela ocorrência de fenômenos primários de natureza exsudativa resultantes das alterações da microcirculação na área do ferimento. A fase inflamatória inicial se caracteriza pela vasodilatação e aumento da permeabilidade

vascular e pode se estender por até 48 horas após o início da lesão. A primeira alteração é a vasodilatação, a qual viabiliza a transcitose de células de defesa, a exemplo dos neutrófilos, responsáveis por constituir a primeira linha de defesa contra a infecção.<sup>17</sup> Com o avanço do reparo tecidual, os fenômenos proliferativos, como a neoangiogênese, a deposição de novos elementos constituintes da matriz extracelular e o processo de reepitelização, passam a predominar no microambiente da lesão.

Até o presente momento, são escassos os estudos que avaliaram comparativamente os efeitos teciduais induzidos pelas terapias biomoduladoras, citadas no processo de reparo tecidual. Diante disso, o objetivo do presente projeto de pesquisa será avaliar, através de um estudo histomorfométrico, em pele de ratos, o infiltrado inflamatório polimorfo e monomorfonuclear, a densidade vascular, a área do colágeno sintetizado e a espessura da epiderme recém-formada, em diferentes fases do reparo.

## Justificativa

Diante da ocorrência de fatores complicadores do reparo tecidual, a exemplo de contaminação bacteriana, tração mecânica excessiva, imunodeficiências, doenças metabólicas como diabetes mellitus, entre outros, torna-se relevante a geração de conhecimento acerca de métodos alternativos que possam modular positivamente a cicatrização dos tecidos afetados. A verificação da verdadeira eficácia dessas terapias, que incluem a fotobiomodulação laser e o uso do ozônio, é necessária para que o seu uso se torne justificado na prática clínica dos profissionais de saúde, em especial, para pacientes que apresentam dificuldade de cicatrização de ferimentos.

Embora já existam alguns trabalhos na literatura que abordem o potencial de ação das terapias biomoduladoras citadas, a realização de um estudo experimental, controlado, *in vivo*, permitirá compreender melhor as alterações teciduais decorrentes da sua utilização durante o processo de cicatrização de ferimentos.<sup>18,19</sup>

## Objetivos

### Geral

- Avaliar os efeitos da fotobiomodulação laser e da ozonioterapia no processo de reparo tecidual de feridas cirúrgicas padronizadas, em pele de ratos, através de análise histomorfométrica.

### Específicos

- Comparar o percentual de células inflamatórias polimorfonucleares e monomorfonucleares, densidade vascular, e a área de fibroplasia e espessura da epiderme entre os grupos de intervenção.
- Comparar, semi e quantitativamente, as variáveis células inflamatórias polimorfonucleares e monomorfonucleares, densidade vascular, área de fibroplasia e espessura da epiderme nos grupos de intervenção em dois momentos distintos da cicatrização do tecido.

## Materiais e métodos

### Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado com o número de protocolo 67/2019. O número do parecer de aprovação pelo CEUA foi CIAEP: 01.0039.2013. Teve início em dezembro de 2019, com a realização de todos os procedimentos descritos a seguir, excetuando-se a análise histomorfométrica, a qual permitirá a realização de um estudo de correlação entre os achados histológicos e os registros termográficos.

### Amostra

Para a amostra do presente estudo, ficou estabelecido como critérios de inclusão que os animais serão ratos machos Wistar, com peso entre 150-300 g, do biotério da Faculdade Adventista da Bahia e, como critério de exclusão, animais que apresentarem alguma alteração, ferida ou doença cutânea. Serão utilizados 40 animais divididos aleatoriamente em 4 grupos de 10 ratos cada, os quais serão sacrificados

no 5º (5 animais) e 10º (5 animais) dias, após os tratamentos propostos. O Grupo 1 corresponderá ao Grupo Controle e não receberá nenhum tratamento; O Grupo 2, denominado Grupo Laser (GL), será submetido à fotobiomodulação laser convencional; O Grupo 3, chamado de Grupo Ozônio (GO), receberá terapia com ozônio gasoso, através de insuflação na borda da lesão, e o Grupo 4, Óleo Ozonizado (GOO), será tratado com óleo na superfície da lesão.

Os ratos serão mantidos em biotério, isolados em gaiolas com identificação, com um animal cada. As condições de temperatura (média de 23 °C), umidade (50 a 52%), assim como a luminosidade do biotério (12 horas com luz artificial e 12 horas em escuridão), serão rigorosamente controladas. Os espécimes serão alimentados diariamente com ração Nuvilah® (Suprilab) específica para a espécie, e água à vontade. Todos os cuidados com relação à limpeza serão tomados e o ambiente protegido de estímulos auditivos, para evitar o estresse.<sup>20</sup> Todos os animais terão origem do biotério da FADBA. Antes do início da pesquisa, os animais serão submetidos a 1 semana de adaptação na gaiola.

### Procedimentos cirúrgicos e utilização das terapias biomoduladoras

De acordo com o peso específico estabelecido para cada animal, os ratos serão anestesiados com uma mistura de Cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml (dose 2 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml (dose 3 mg/kg). Constatada a sedação, será realizada remoção dos pelos na região dorsal, próxima ao coxim adiposo, seguida por antissepsia com iodopovidine (Rioquímica, São Paulo, Brasil). Será realizado um ferimento padronizado na pele dos animais com um bisturi circular de 6 mm de diâmetro (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha). A indução do ferimento será realizada por apenas um operador devidamente calibrado. Os animais pertencentes ao primeiro grupo experimental, Grupo Controle (GC), serão tratados com simulação das terapias propostas.

Os animais pertencentes ao Grupo Laser (GL) serão tratados com laser diodo semiconductor (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil) AsAlGa, 9 mW, 670 nm,

0,031 W/cm<sup>2</sup>, com emissão contínua e área da ponta ativa de 0,28 cm<sup>2</sup>. Em cada vértice diametral da ferida circular será aplicado 1 J/cm<sup>2</sup>, que corresponderá a uma dosimetria total de 4 J/cm<sup>2</sup>, por dia de aplicação. Os animais serão tratados por três dias consecutivos e a fluência total ofertada ao tecido será de 12 J/cm<sup>2</sup>.

No terceiro grupo do experimento, representado pelo gás ozônio (GGO), a aplicação diária do ozônio, por 3 dias consecutivos, será realizada com uma seringa de 5 ml e aproximadamente 1 ml da mistura do ozônio com oxigênio será insuflado nos vértices diametraes da ferida circular, nas bordas externas da lesão. A geração de ozônio será produzida através do gerador Philozon® (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil). A partir do compartilhamento do cilindro com oxigênio medicinal, será adotada uma concentração de 13 µg/ml de ozônio e fluxo de 1 L/min, de forma constante. Quanto ao quarto grupo experimental, que será tratado com óleo ozonizado (GOO), os ratos serão submetidos à realização dos ferimentos seguindo os mesmos padrões do Grupo Controle (GC) mais instilação no centro da lesão de 1 gota de óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil), também durante 3 dias.

Ao final dos 5º e 10º dias do experimento, serão sacrificados 5 animais pertencentes a cada grupo experimental. A eutanásia será realizada mediante utilização de uma sobredose da solução anestésica já especificada e, após constatação de sedação profunda, os espécimes serão colocados em uma câmara de CO<sub>2</sub> com concentração de 5 litros por minuto.

### **Processamento histológico**

Após a confirmação de morte, será removida uma porção de tecido, do dorso dos ratos, que compreenderá a ferida cirúrgica. O espécime cirúrgico será fixado por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponado.

O tecido será processado para a coloração com hematoxilina-eosina e Sírius vermelho.

### **Avaliação histológica e morfometria**

A captura das imagens dos cortes teciduais submetidos às colorações descritas será realizada através do

software Motic Images Advanced 3.0® (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Será estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 13107,200000 *pixels*. Dez imagens padrão, correspondentes a cada caso, serão capturadas com a dimensão estabelecida, nas quais será mensurado o número de vasos, a área de colágeno e a espessura da epiderme recém-formada. Cada área será capturada no aumento de 40 x e salva em formato JPEG.

As lâminas serão codificadas e todas as análises serão feitas por dois examinadores calibrados de forma duplo-cega. O grau de inflamação no tecido será aferido nos mesmos moldes descritos por Sampaio et al.<sup>21</sup> Será realizado um estudo semiquantitativo dos cortes, analisando as variáveis do processo inflamatório como infiltrado polimorfonuclear, monomorfonuclear e edema, adotando-se os critérios de ausente (0), discreto (+), moderado (++) e intenso (+++). A fim de definir tais graus histológicos, serão adotados os seguintes critérios: quando a alteração se fizer presente em percentual igual ou maior que 50% na secção analisada, o grau será considerado intenso; para 25 a 50% do tecido, grau moderado; e menor ou igual a 25%, discreto.

### **Análise estatística**

O cálculo do tamanho amostral do presente estudo seguirá os princípios dos 3Rs de Russell e Brush<sup>22</sup>, os quais preconizam o *replacement* (troca, se possível, dos experimentos com animais por invertebrados ou *in vitro*); o *refined* (a técnica deve ser refinada para que não haja sofrimento, deve ser feita com anestesia e analgesia); o *reduce* (deve-se utilizar a quantidade mínima de animais para se alcançar os objetivos científicos). Nesse aspecto, segundo estudos de Eckelman et al.<sup>23</sup>, para determinar o número de animais necessários para se alcançar uma significância de p<0,05, com diferença em % entre o grupo controle e o grupo tratamento/doença de 30% e com coeficiente de variação (CV) de 20% para ratos Wistar, será estabelecido o número de 5 ratos por grupo (Tabela 1).<sup>24</sup> Para isso, a área do colágeno será escolhida como desfecho primário e, de acordo com a literatura, terapias com laser podem aumentar o incremento do colágeno em 30%.<sup>25</sup>

**Tabela 1.** Cálculo do tamanho amostral

Animais necessários para um resultado estatisticamente significativo			
Diferença percentual entre controle e tratamento e médias de grupo	CV percentual devido a variabilidade biológica	Número dos animais	Significado (P b.05)
20	20	2-7	não significativo
20	20	8 5 5	Significativo
20	15	5 5	Significativo
25	20		Quase significativo
30	20		Significativo
25	15		Significativo

Fonte: Eckelman, Kilbourn, Joyal, Labiris, Valliant.<sup>23</sup>

Serão avaliadas três variáveis quantitativas: área do colágeno, número de vasos e espessura do epitélio e três variáveis semiquantitativas: células polimorfonucleares, monomorfonucleares e edema.

Será criado um banco de dados no Microsoft® Excel® 2010 (versão 14.0.7132.5000), Microsoft® Office Professional Plus 2010, USA e analisado no software R (versão 3.1.1). A distribuição dos dados quanto à normalidade será testada. Será utilizado o teste ANOVA, seguido do teste post hoc Bonferroni. O nível de significância será  $p < 0,05$ .

### Resultados esperados

Espera-se verificar a eficácia das terapias biomoduladoras já descritas, no tocante às variáveis do reparo tecidual, e determinar qual dos três recursos terapêuticos exercerá um efeito mais benéfico no processo de cicatrização cutânea.

### Contribuições dos autores

Lima FQ participou do levantamento da literatura e discussão do projeto de pesquisa. Marchionni AM e Medrado AP desenvolveram a concepção inicial do projeto e participaram da construção metodológica deste. Medrado AP realizou a revisão crítica do projeto.

### Conflitos de interesses

Nenhum conflito financeiro, legal ou político envolvendo terceiros (governo, empresas e fundações privadas, etc.) foi declarado para nenhum aspecto do trabalho submetido (incluindo, mas não se limitando a subvenções e financiamentos, participação em conselho consultivo, desenho de estudo, preparação de manuscrito, análise estatística, etc.).

### Indexadores

A Journal Evidence-Based Healthcare é indexada no [EBSCO](#) e [DOAJ](#).

**EBSCO**

**DOAJ**

### Referências

1. Müller KP, Rodrigues CRMD, Núñez SC, Rocha R, Jorge AOC, Ribeiro MS. Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats. Arch Oral Biol. 2007;52(7):648-54. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.12.018>
2. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior ECP, Carvalho PTC. 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. 2014;29(1):313-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1341-2>
3. Tabakoglu HO, Sani MM, Uba AI, Abdullahi UA. Assessment of circular wound healing in rats after exposure to 808-nm laser pulses during specific healing phases. Lasers Surg Med. 2016;48(4):409-15. <https://doi.org/10.1002/lsm.22462>

4. Colombo F, Valença Neto AAP, Sousa APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRA. Effect of low-level laser therapy (l660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. *Braz Dent J*. 2013;24(4):308-12. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201301867>
5. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Lalucci MPPS, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:294-305. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.015>
6. Dortbudak O, Hass R, Malath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(6):540-45. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2000.011006540.x>
7. Moreira SH, Pazzini JM, Álvarez JLG, Cassino PC, Bustamante CC, Bernardes FJL, et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). *Lasers Med Sci*. 2020;35(5):1103-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y>
8. Gonçalves RV, Mezêncio JMS, Benevides GP, Matta SLP, Neves CA, Sarandy MM, et al. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(4):350-55. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500022>
9. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. *Diabetes Metab Syndr*. 2011;5(1):45-49. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2010.05.014>
10. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. *Arch Med Res*. 2006;37(4):425-435. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
11. Rowen RJ. Ozone therapy as a primary and sole treatment for acute bacterial infection: case report. *Med Gas Res*. 2018;8(3):121-24. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.241078>
12. Rodrigues KL, Cardoso CC, Caputo LR, Carvalho JCT, Fiorini JE, Schneedorf JM. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. *Inflammopharmacology*. 2004;12(3):261-70. <https://doi.org/10.1163/1568560042342275>
13. Schulz S. The role of ozone/oxygen in clindamycin-associated enterocolitis in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). *Lab Anim*. 1986;20(1):41-8. <https://doi.org/10.1258/002367786781062160>
14. Kazancioglu HO, Erisen M. Comparison of low-level laser therapy versus ozone therapy in the treatment of oral lichen planus. *Ann Dermatol*. 2015;27(5):485-91. <https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.5.485>
15. Grootveld M, Aylin B, Siddiqui N, Sim J, Silwood C, Lynch E. History of the clinical applications of ozone. In: Lynch E, editor. *Ozone: the revolution in dentistry*. London: Quintessence Publishing Co; 2004. p. 23-31.
16. Alan H, Vardi N, Özgür C, Acar AH, Yolcu Ü, Doğan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *J Craniofac Surg*. 2015;26(5):e396-400. <https://doi.org/10.1097/scs.0000000000001871>
17. Orsted HL, Keast D, Forest-Lalande L, Mégie MF. Basic principles of wound healing: an understanding of the basic physiology of wound healing provides the clinician with the framework necessary to implement the basic principles of chronic wound care. *Wound Care Canada* [Internet]. 2004;9(2):4-13. Disponível em: <https://www.woundscanada.ca/docman/public/wound-care-canada-magazine/2011-vol-9-no-2/424-wcc-spring-2011-v9n2-principles-wound-healing/file>
18. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade, ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 2008;92(3):144-52. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.05.008>
19. Silva, DCGG, Plapler H, Costa MM, Silva SRG, Sá MCA, Silva BSL. Laser de baixa intensidade (AlGaInP) aplicado com 5J/cm<sup>2</sup> reduz a proliferação de *Staphylococcus aureus* MRSA em feridas infectadas e em pele íntegra de ratos. *An Bras Dermatol*. 2013;88(1):50-5. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962013000100005>
20. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. The fundamentals of experiments with animals - applications in experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(1):103-11. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000100024>
21. Sampaio LAS, Costa JS, Freire TFC, Reis SRA, Deiró TCBJ, Medrado ARAP. Influence of protein malnutrition on cutaneous wound healing in rats. *Rev Nutr*. 2018;31(5):433-42. <https://doi.org/10.1590/1678-98652018000500001>
22. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015; 54(2):120-32. Cited: PMID: [25836957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25836957/).
23. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experimente. *Nucl Med and Biol*. 2007;34(3):229-32. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.01.005>
24. Scheibe PO. Number of samples - hypothesis testing. *Nucl Med Biol*. 2008;35(1):3-9. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.10.006>
25. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade ZA, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *Int Wound J*. 2018;15(2):274-82. <https://doi.org/10.1111/iwj.12861>