PATRICIA KELER FREITAS MACHADO VASCONCELLOS

DINÂMICA DE FORMAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU PADRONIZADAS NO DORSO DE RATOS (*RATTUS NORVEGICCUS*, LINHAGEM *WISTAR*) TRATADAS COM LASERTERAPIA (AlGaInP λ =660nm) ASSOCIADA OU NÃO À MEMBRANA DE BIOCELULOSE BACTERIANA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, Curso de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa A. Gurgel Rocha

Salvador 2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

V331 Vasconcellos, Patricia Keler Freitas Machado Dinâmica de formação da matriz extracelular em queimaduras de segundo grau padronizadas no dorso de ratos (*Rattus Norvegiccus*, linhagem *Wistar*) tratadas com laserterapia (AlGaInP λ=660nm) associada ou não à membrana de biocelulose bacteriana / Patricia Keler Freitas Machado Vasconcellos. – Salvador, 2014. 62 f. Orientadora: Prof^a Dr^a Clarissa Araújo Gurgel Rocha.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, 2014.
1. Queimadura. 2. Laser. 3. Laserterapia. I. Gurgel, Clarissa Araújo Rocha. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título. CDU 616-001



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE ODONTOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODNTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. PATRÍCIA KELER FREITAS MACHADO VASCONCELLOS

DINÂMICA DE FORMAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU PADRONIZADAS NO DORSO DE RATOS (*RATTUS NORVEGICCUS*, LINHAGEM *WISTAR*) TRATADAS COM LASERTERAPIA (AlGaInP λ =660nm) ASSOCIADA OU NÃO À MEMBRANA DE BIOCELULOSE BACTERIANA.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Charissa Áraújo Gurgel Rocha(Orientadora) Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

angrees

Profa. Dra. Aparecida Maria Cordeiro Marques (Examinador Interno) Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos (Examinador Externo) Professor da Fundação Oswaldo Cruz

А

Alan, por seu amor, paciência e compreensão que me possibilitaram caminhar sem preocupações durante minha jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu inestimável amor e perdão por minhas falhas.

Aos **meus pais**, pela vida. Ao **meu pai**, pela educação, amor e constante presença em tudo. À **minha família**, por compreender que as ausências são consequência do caminho escolhido.

À minha orientadora **Dra. Clarissa Gurgel**, por acreditar e me fazer acreditar no meu potencial, pelo estímulo, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e pelo exemplo de retidão. O seu amor pela pesquisa e sua vontade de fazer o certo da melhor forma possível são contagiantes!

À Professora **Dra. Águida Henriques,** pela colaboração com seus conhecimentos e também pelo compromisso e inestimável simpatia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, na pessoa da Coordenadora professora **Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho** e do Vice Coordenador professor **Dr. Jean Nunes dos Santos**.

À amiga doutoranda Adna Barros, por sua amizade, estímulo e confiança.

Às amigas **Rosane Borges** e **Ludimila Valverde**, pelo carinho e boa vontade em me ajudar sempre!

Aos amigos da **turma de Mestrado**, pelos bons momentos vividos e pela contribuição que cada um teve, em algum momento, para o meu crescimento.

À doutoranda Caroline Brandi, por tirar minhas dúvidas sempre que precisei.

Aos **Bolsistas** do nosso grupo de pesquisa, pela ajuda e companhia no Laboratório de Pesquisa e Biologia Molecular.

À **Fiocruz-CPqGM**, pela possibilidade de execução da etapa experimental no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

A **Cleyton** da Secretaria e **Márcio** da Histotecnologia da Fiocruz-CPqGM, por se mostrarem sempre solícitos quando precisei.

À **Fapesb**, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar em uma coisa diferente.

Roger Von Oech

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica de formação da matriz extracelular no processo de reparo de queimaduras de segundo grau padronizadas, em dorso de ratos (Rattus norvegiccus, linhagem Wistar), tratadas com a laserterapia com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (AlGaInP) associada ou não à membrana de celulose (NEXFILL[®]). Quarenta e oito animais foram alocados em quatro grupos, como segue: Grupo Controle (sem tratamento), Grupo I (tratamento com Laser AlGaInP, λ =660nm), Grupo II (tratamento com biomembrana de celulose NEXFILL[®]) e Grupo III (tratamento com laser AlGaInP, λ =660nm associado à biomembrana de celulose NEXFILL[®]). As irradiações foram realizadas imediatamente após a confecção da queimadura e a cada 48 horas, até um dia antes da morte dos animais, que se deu às 24 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias. As lesões foram excisadas e analisadas em microscopia de luz. A formação de matriz extracelular foi avaliada através do método imuno-histoquímico polimérico (AdvanceTM, Dako Corporation), utilizando anticorpos direcionados contra as proteínas colágeno tipo III, colágeno tipo I, fibronectina e laminina. Os grupos foram comparados utilizando o teste de proporções de Fisher (p<0.05). Observou-se maior quantidade de colágeno tipo III nos grupos controle, II e III, quando comparados ao grupo I (p<0.05). Em relação ao colágeno tipo I, os grupos I e III apresentaram uma maior deposição dessa proteína em relação ao grupo II (p<0.05). Porém não houve diferença na deposição do colágeno I entre os grupos I e III e o grupo controle. Além disso, um maior preenchimento por fibronectina foi descrito para o grupo III quando comparado ao grupo II (p<0.05). Quanto ao padrão de marcação da laminina na lâmina basal, o grupo I se mostrou com um padrão de descontinuidade e esse resultado foi significante quando esse grupo foi comparado com os grupos controle, II e III (p<0.05). Neste estudo, não foi observada uma ação do laser isoladamente (Grupo I) na dinâmica de deposição dos colágenos III e I, bem como no padrão das fibras colágenas (fibrilar e/ou reticular) e aceleração do reparo das lesões de queimaduras de segundo grau induzidas no dorso dos ratos. A continuidade da marcação de laminina na membrana basal subepitelial nos grupos II e III sugere que a membrana de celulose isoladamente ou em associação com o laser favoreceu a reepitelização de queimaduras de segundo grau.

PALAVRAS-CHAVE: Queimaduras de segundo grau. Laser. Biomembrana de celulose. Reparo tecidual.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the dynamics of deposition of extracellular matrix proteins in the healing process of second-degree burn patterned in the dorsum of rats (Rattus norvegiccus, Wistar). The wounds were treated with lasertherapy using laser indium phosphide-gallium-aluminum (AlGaInP) associated or not with biological cellulose membrane (NEXFILLTM). Forty-eight animals were further divided into four groups as follows: Control group (without treatment), Group I (treatment with AlGaInP laser, λ =660nm), Group II (treatment with biological cellulose membrane NEXFILLTM) and Group III (treatment with AlGaInP laser, λ =660nm associated with biological cellulose membrane NEXFILLTM). Irradiations were performed immediately after the induction of the burn and every 48 hours, up to a day before the death of the animals, which occurred at 24 hours, 3 days, 7 days and 14 days. The lesions were excised and analyzed by light microscopy. Extracellular matrix deposition was assessed by immunohistochemistry using a polymer system (AdvanceTM, Dako Corporation) and antibodies directed against the following proteins: collagen type III and type I, fibronectin and laminin. Differences among the groups were assessed using the Fisher Test (p < 0.05). We observed a higher amount of collagen type III in the groups Control, II and III, when they were compared to Group I (p<0.05). Groups I and III showed higher deposition of collagen I when they were compared to group II (p<0,05), but the amount of collagen I was similar in groups I, III and Control. Group III exhibited a higher filling of fibronectin in comparison to Group II (p<0.05). With respect to laminin, Group I exhibited a predominant pattern of discontinuity in basal lamina comparing with control, II and III groups (p<0,05). In conclusion, in this study, the laser used alone (Group I) has not influenced the deposition of collagens III and I as well as on the pattern of fibers (fibrillar and/or reticular). In addition, the laser did not accelerated the repair of seconddegree burn-induced lesions. Continuous labeling of laminin in groups II and III suggests that the biological cellulose membrane promoted a better reepithelialization of these wounds.

KEY-WORDS: Second-degree burns. Laser. Biological cellulose membrane. Tissue repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Distribuição dos colágenos I e III nos grupos experimentais, de acordo 36 com os tempos de morte dos animais. Comparação dos escores dos colágenos III e I e fibronectina entre os Figura 2 36 grupos experimentais, independente dos tempos de morte. Comparação do padrão de continuidade da laminina na lâmina basal Figura 3 37 subepitelial entre os grupos, independente dos tempos experimentais. Imunodetecção do colágeno III. Todos os grupos apresentaram evolução Figura 4 38 da deposição de colágeno tipo III, contudo o grupo I (laser) apresentou a menor deposição dessa proteína em todos os tempos experimentais (p<0.05). A: grupo controle três dias; B: grupo controle sete dias; C: grupo controle 14 dias; D: grupo I (laser) três dias; E: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; H: grupo II sete dias; I: grupo II 14 dias; J: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; K: grupo III sete dias; L: grupo III 14 dias. Observa-se um maior paralelismo entre as fibras no 14° dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens -Original, HRP, 40X. Imunodetecção do colágeno I. Os grupos experimentais apresentaram Figura 5 40 evolução da deposição de colágeno tipo I de modo semelhante ao grupo controle. A: grupo controle três dias; B: grupo controle sete dias; C: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; H: grupo II sete dias; I: grupo II 14 dias; J: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; K: grupo III sete dias; L: grupo III 14 dias. Observa-se um maior paralelismo entre as fibras no 14° dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens -Original, HRP, 40X. Figura 6 Imunodetecção da fibronectina. O grupo II apresentou menor deposição 42 de fibronectina quando comparado aos outros grupos (p<0.05). A: grupo controle três dias; B: grupo controle sete dias; C: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill®) três dias; H: grupo II sete dias; I: grupo II 14 dias; J: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; K: grupo III sete dias; L: grupo III 14 dias. Todas as imagens – Original, HRP, 40X. Imunodetecção da laminina. O grupo I (laser) apresentou significante Figura 7 44 marcação descontínua da lâmina basal subepitelial quando comparado aos outros grupos experimentais (p<0.05). A: grupo controle três dias; B: grupo controle sete dias; C: grupo controle 14 dias; D: grupo I (laser) três dias; E: grupo I sete dias; F: grupo I 14 dias; G: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; H: grupo II sete dias; I: grupo II 14 dias; J: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; K: grupo III sete dias; L: grupo III 14 dias. Todas as imagens - Original, HRP, 40X.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos animais por grupo experimental.	27
Tabela 2	Clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos.	29
Tabela 3	Percentual de marcação, continuidade e espessura da laminina na lâmina basal subepitelial.	34
Tabela 4	Percentual de marcação, continuidade e espessura da laminina na lâmina basal vascular.	34
Tabela 5	Distribuição da fibronectina subjacente à membrana basal subepitelial e na MEC.	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AlGaInP	Fosfeto de índio-gálio-alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
СВ	Celulose Bacteriana
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Sigla na língua inglesa para Ácido Desoxirribonucleico
HeNe	Hélio-Neónio
HIV	Sigla na língua inglesa para o vírus da imunodeficiência humana
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PA	Pró-análise
RNA	Sigla na língua inglesa para Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
S	Segundo
t	Tempo
TGF-β	Sigla na língua inglesa para Fator de Crescimento Transformador-beta
%	Representação simbólica de porcentagem
J/cm^2	Razão entre as unidades de medida joule e centímetro quadrado
mg/kg	Razão entre as unidades de medida de massa miligrama e quilograma
mW	Milliwatts – unidade de medida para aferição da potência equivalente a 10^{-3} watt
nm	Nanômetro – unidade de medida equivalente a 10 ⁻⁹ metro
Ø	Representação simbólica do tamanho do spot, área do feixe de luz emitido pelo aparelho laser ou da ponta ativa da caneta emissora.
°C	Medida de temperatura - Grau Celsius
λ	Representação simbólica da grandeza comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	MATRIZ EXTRACELULAR	14
2.2	DINÂMICA DO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL	16
2.3	QUEIMADURAS	18
2.4	A CELULOSE BACTERIANA E O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL	20
2.5	LASER E FOTOBIOMODULAÇÃO	22
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MÉTODOS	27
4.1	COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	27
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
4.3	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	28
4.4	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	30
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS	31
5.1	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	31
5.1.1	Três dias	31
5.1.2	Sete dias	32
5.1.3	Catorze dias	33

6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO A	60
	ANEXO B	61

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras representam uma das formas mais comuns de trauma entre os seres humanos (Ñunez et al., 2012) e, a despeito do decréscimo da mortalidade em decorrência de queimaduras ao redor do mundo, as suas sequelas não fatais frequentemente causam deficiência permanente (Peck, 2011). Nessas lesões, as consequências clínicas e o processo de reparo dependem da extensão e profundidade do dano. Em muitos casos, as queimaduras podem ser tratadas de forma imediata com enxertos autógenos de pele, o que produz rápido, permanente e satisfatório fechamento da ferida. Entretanto, em muitas situações este tipo de tratamento é impossível ou improvável de ter sucesso, como no caso de feridas infectadas ou muito extensas (Saflle, 2009; Ferreira et al., 2011).

Assim, os curativos temporários tornam-se necessários para manter a viabilidade da ferida, reduzir infecção, limitar a dor e o estresse metabólico, além de favorecer o suprimento sanguíneo e proteção contra traumas (Latarjet, 1995; Saflle, 2009; Guirro et al., 2010a). Dessa forma, pesquisas no campo dos curativos de feridas têm resultado na produção de uma grande variedade de curativos sintéticos e biológicos (Balasubramani; Kumar; Babu, 2001). Dentre as opções disponíveis, encontra-se a biomembrana celulose bacteriana, um polímero biossintetizado que, devido à sua nanomorfologia, fornece um ambiente ótimo para a regeneração epidérmica, funcionando como barreira contra infecção e perda de fluidos ao mesmo tempo em que permite introdução de substâncias terapêuticas nas feridas (Czaja et al., 2006, Pecoraro et al., 2008; Petersen; Gatenholm, 2011).

A influência do laser na cicatrização de feridas também tem sido motivo de diversos estudos experimentais, muitos destes ratificando uma ação bioestimuladora e cicatrizante (Stein et al., 2005; Rocha Junior et al., 2006; Demidova-Rice et al., 2007; Bensadoun; Nair, 2012; Martu et al., 2012). Os efeitos deste tipo de terapia resultam na ocorrência de eventos celulares e vasculares, os quais parecem interferir diretamente no processo de reparo tecidual (Lins et al., 2010). Em virtude disso, tem sido frequente a realização de pesquisas sobre os efeitos fotobiomoduladores do laser sobre queimaduras (Bayat et al., 2005; Al-Watban; Delgado, 2005; Meirelles et al., 2008; Ñunes et al., 2012) e, mais recentemente, tem surgido trabalhos buscando associar o laser aos curativos oclusivos (Guirro et al., 2010 (b); Dantas et al., 2011). Entretanto, ainda não há relatos da associação da membrana de biocelulose bacteriana ao laser no processo de reparo de queimaduras de segundo grau.

Diante do exposto, e em virtude das características positivas da biomembrana de celulose bacteriana e do laser, entende-se que é interessante a realização de estudos que possibilitem a avaliação dos possíveis efeitos benéficos da associação destas duas terapias no tratamento das lesões de queimaduras, tornando a sua cicatrização mais rápida e eficiente, menos dolorosa e com melhores resultados funcionais e cosméticos. Para isso, este trabalho se propõe a estudar a formação de matriz extracelular no processo de reparo de queimaduras de segundo grau, nas quais foram aplicadas as terapias supracitadas associadas ou isoladamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MATRIZ EXTRACELULAR

Diante de uma lesão contra as células e os tecidos, inicia-se uma série de eventos que objetivam conter a lesão e iniciar o processo de cura, que se dará por regeneração, reparo ou pela combinação de ambos. A regeneração é o processo pelo qual ocorre restituição completa do tecido lesado, enquanto no reparo ou cicatrização ocorre restauração de algumas estruturas originais, com alguns desarranjos, e formação de cicatriz pela deposição de colágeno. Os processos de regeneração e cicatrização no reparo das feridas cutâneas dependem, dentre outros fatores, da extensão e da profundidade da lesão. Neste aspecto, a integridade da matriz extracelular (MEC) constitui quesito fundamental para que a cura se processe por regeneração. Isto ocorre porque os componentes da MEC desempenham papéis diferentes e essenciais, regulando o crescimento, a proliferação, o movimento e a diferenciação das células que vivem no seu interior, de modo que a lesão à MEC acarreta invariavelmente a formação predominante de cicatriz no processo de reparo (Kumar et al., 2010).

Até recentemente considerada como um suporte inerte para as células que a circundam, hoje se sabe que a MEC representa um ambiente complexo e dinâmico onde há uma permanente interação com as células através de receptores como as integrinas. Através dessa interação, a MEC oferece sinais às células controlando a forma, a migração, a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência (Labat-Robert, 2012), além de fornecer suporte mecânico para ancoragem e arcabouço para renovação tecidual (Kumar et al., 2010). Além disso, esses receptores de superfície celular fornecem pontos de fixação que as células podem usar para detectar distúrbios mecânicos que, juntamente com fatores de crescimento e citocinas, remodelam a matriz depositada para torná-la estrutural e funcionalmente viável (Schultz; Wysocki, 2008).

As macromoléculas que compõem a MEC desempenham funções importantes e distintas e a sua organização é um processo dinâmico cuja composição muda durante o desenvolvimento, a maturidade, patologias e envelhecimento (Labat-Robert, 2012). O **colágeno** é a proteína mais abundante no mundo animal e, juntamente com a elastina, fibrilina e fibras elásticas, promove a resistência à tensão e retração (Kumar et al., 2010). O papel do

colágeno na cicatrização de feridas tem sido bem descrito. Além de conter informações para as células que entram em contato com este, os produtos da degradação do colágeno tem sido reconhecidos como potenciais quimioatratantes de vários tipos celulares (Balasubramani; Kumar; Babu, 2001).

As **proteínas de adesão celular**, como fibronectina e a laminina, outro grupo de macromoléculas da MEC, conectam os elementos da matriz uns aos outros e às células. Essas proteínas de ligação agem como receptores transmembrana ou ficam armazenadas no citoplasma, onde desempenham funções específicas: promovem a interação célula-célula e célula-MEC, participam da formação e manutenção dos vasos sanguíneos neoformados, auxiliam na estabilização do coágulo e promovem a ligação das células ao citoesqueleto, possibilitando que forças físicas sejam traduzidas em respostas biomoleculares como a ativação ou inibição de fatores de crescimento, proliferação e diferenciação celulares, síntese de colágeno e contração da ferida (Widgerow, 2011).

Como um componente onipresente, a **fibronectina** desempenha papel fundamental na estruturação tridimensional da MEC, fornecendo conexão para as células através de receptores, como as integrinas. Além da adesão, influencia diretamente o comportamento celular na distribuição, migração e morfologia, organização do citoesqueleto, expressão gênica e transformação oncogênica (Rozario; DeSimone, 2010; Schwarzbauer; DeSimone, 2011; Labat-Robert, 2012; Lenselink, 2013). É uma glicoproteína de alto peso molecular encontrada em todos os tipos de tecidos e que interage com as células em todos os estágios do reparo de feridas, já estando presente em grande quantidade na fase de hemostasia no coágulo de fibrina-fibronectina. A fibronectina se liga à heparina, fibrina, colágeno, células e citocinas e à própria fibronectina (Lenselink, 2013).

As lamininas também são moléculas de adesão de células e compõem uma família de glicoproteínas encontrada predominantemente em membranas basais, que é uma MEC especializada localizada subjacente ao epitélio ou no endotélio dos vasos e também ao redor de células musculares, células de Schwann, células gordurosas, nervos periféricos e sistema nervoso central (SNC) (Miner, 2008; Durbeej, 2010). Muitas lamininas se unem para formar redes que permanecem em estreita associação com as células por meio de interações com os receptores da superfície celular. As lamininas são vitais para muitas funções fisiológicas, essenciais para o início do desenvolvimento embrionário e organogênese e têm funções cruciais em diversos tecidos, incluindo músculos, nervos, pele, rim, pulmão, e sistema

vascular (Durbeej, 2010). Trabalhos recentes apontam para o papel de algumas subunidades de laminina na adesão, motilidade e sinalização celular (Hamill; Paller; Jones, 2010).

Os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos constituem outro grupo de macromoléculas componente da MEC, que já foram descritos apenas como substância fundamental, cuja principal função era organizar a MEC, mas atualmente são reconhecidos que possuírem diversos papéis na regulação da estrutura e permeabilidade do tecido conjuntivo (Kumar et al., 2010).

2.2 DINÂMICA DO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

A hemostasia é a fase inicial que ocorre dentro de segundos ou minutos depois da agressão inicial (Gantwerker; Hom, 2012) e é o resultado da ativação das vias de coagulação, que resultam na formação de um coágulo sanguíneo na superfície da ferida. O coágulo contém fibrina, fibronectina, componentes do complemento e agregados de plaquetas, detendo o sangramento (Kumar et al., 2010). As plaquetas ativadas liberam seus grânulos contendo citocinas, hormônios e quimiocinas desencadeantes das outras fases da cicatrização, atraindo células inflamatórias para o local da agressão (Midwood et al., 2004; Gantwerker; Hom, 2012). Pequenos vasos são sinalizados a dilatar e permitir o influxo de leucócitos, células vermelhas sanguíneas e proteínas plasmáticas. A fibrina polimerizada ajuda a formar um arcabouço para a infiltração de células que são chave para as subsequentes fases do reparo (Gantwerker; Hom, 2012).

A fase de **inflamação** é anunciada pelo influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da lesão. Os neutrófilos são as primeiras células no local, chegando em massa nas primeiras 24 horas, e o resultado de sua apoptose atrai os macrófagos, que, juntamente com os linfócitos, aparecem na ferida para fazer a remoção de debris e bactérias. Os macrófagos permanecem na lesão até o final da fase de inflamação e são consideradas as células chave dessa importante fase do reparo (Midwood et al., 2004; Kumar et al., 2010; Gantwerker; Hom, 2012). A inibição ou prolongamento da fase de inflamação pode resultar em um reparo impróprio, podendo levar à ferida crônica, diminuição da velocidade de cura e, eventualmente, mais cicatriz (Gantwerker; Hom, 2012).

A fase de reparo ou proliferação envolve o brotamento de capilares, a migração e proliferação dos fibroblastos e produção de colágeno imaturo (tipo III) para preencher os defeitos deixados ao longo do debridamento da ferida (Gantwerker; Hom, 2012). Essa proliferação fibroblástica e de capilares dá origem ao tecido de granulação, um tipo de tecido especializado rico em fibronectina e colágeno que é o ponto de referência do reparo tecidual e é predominante na cicatrização por segunda intenção (Midwood et al., 2004; Kumar et al., 2010; Gantwerker; Hom, 2012). As proteínas da MEC fibrina, fibronectina e colágeno contribuem para a estabilidade estrutural durante as fases do reparo (Midwood et al., 2004).

Os macrófagos são as principais fontes de quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas, exercendo, além da sua atividade antimicrobiana e de remoção de debris, importante papel na quimiotaxia, angiogênese, deposição e remodelação da MEC (Kumar et al., 2010). As células basais dentro dos bulbos de seus folículos e glândulas se diferenciam em ceratinócitos e repovoam o estrato basal, iniciando a migração sobre a borda da ferida. Uma vez que elas encontram o mesênquima da MEC, se anexam próximo da borda interna da ferida e iniciam o estabelecimento de uma nova membrana basal (Gantwerker; Hom, 2012).

A **angiogênese** segue um padrão típico de brotamento sinalizado por um complexo gradiente de citocinas. Estes pequenos e delicados vasos repovoam a derme e qualquer trauma nesta área leva à destruição destes vasos e atraso na cicatrização. A angiogênese também é afetada pelo fechamento primário (por primeira intenção) ou secundário (por segunda intenção) e é acelerada pelo fechamento primário (Gantwerker; Hom, 2012).

A fase de **remodelação** começa com a substituição da MEC provisória e do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I e as células remanescentes das outras fases sofrem apoptose. Com o estabelecimento do colágeno tipo I, ocorre o aumento substancial da resistência à tensão (Gantwerker; Hom, 2012), entretanto, a menor força tênsil na ferida curada pode persistir pelo resto da vida (Kumar et al., 2010). O tecido de granulação começa a involuir, o excesso de vasos sanguíneos a retrair e, então, juntamente com o aumento da deposição de colágeno, a ferida adquire uma aparência empalidecida, com perda permanente dos anexos dérmicos (Kumar et al., 2010). O sucesso da fase de remodelação envolve um delicado equilíbrio entre síntese e lise dos componentes da MEC, esta última sendo realizada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs). A síntese é altamente energia-dependente e qualquer depleção dos nutrientes empurra o *balance* para lise, afetando o processo de cicatrização. O excesso de fibrose neste estágio resulta em cicatriz hipertrófica (com a cicatriz saliente limitada à área da

ferida) ou formação de queloide (com a cicatriz ultrapassando os limites da ferida original) (Kumar et al., 2010; Gantwerker; Hom, 2012).

2.3 QUEIMADURAS

Uma queimadura é definida como um dano na pele ou outro tecido orgânico causado, primariamente, por agressão térmica. Uma queimadura ocorre quando algumas ou todas as células da pele ou outros tecidos são destruídas por líquidos quentes (escaldos), sólidos quentes (queimadura de contato) ou chamas. Lesões na pele ou outros tecidos orgânicos devido à radiação, radioatividade, eletricidade, fricção ou contato com químicos também são definidos como queimaduras (Latarjet, 1995; Peck, 2011; WHO, 2013). As queimaduras são um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que 195 mil mortes ocorram a cada ano somente em decorrência de incêndios. Mais mortes são decorrentes de queimaduras térmicas, elétricas e outras formas, porém com poucos dados disponíveis ao redor do mundo. Mortes relacionadas apenas ao fogo estão entre as 15 principais causas de óbito entre crianças e adultos jovens de cinco a 29 anos (WHO, 2013).

Além daqueles que morrem em decorrência das queimaduras, outros milhões são deixados com deficiência ao longo da vida, com desfigurações e consequente estigma e rejeição (WHO, 2013). A incidência de queimaduras graves foi de aproximadamente 11 milhões de pessoas ao redor do mundo em 2004, ficando no quinto lugar entre todas as morbidades, sendo maior que a combinação de infecções por tuberculose e HIV (Peck, 2011). Morbidade e mortalidade devido a fogo e incêndios têm declinado ao redor do mundo nas últimas décadas, entretanto, 95% das mortes por queimaduras ocorrem em países de média ou baixa renda, onde os programas de prevenção são incomuns e a qualidade dos cuidados das lesões agudas é inconsistente (Peck, 2011; WHO, 2013).

O sofrimento causado por queimaduras é ainda mais importante por tratar-se de problema evitável. Países de alta renda têm feito progressos consideráveis na redução das taxas de mortes por queimaduras, por meio de combinação de estratégias comprovadas de prevenção e através de melhorias no atendimento das vítimas. A maioria destes avanços na prevenção e cuidados não foi totalmente aplicada em países de renda baixa e média.

Intensificar os esforços para fazê-los levaria a reduções significativas nas taxas de morte e incapacidade relacionadas a queimaduras (WHO, 2013).

As queimaduras são classificadas de acordo com a extensão e profundidade da ferida, o que está diretamente relacionado à sua severidade. A extensão de uma queimadura é expressa pela quantidade de superfície de área lesionada em relação à área total do corpo, enquanto que, quanto à profundidade, elas podem ser classificadas em primeiro, segundo ou terceiro grau (Quinn et al., 1985).

De acordo com essa classificação, estas possuem características clínicas e histológicas diferentes. As queimaduras de primeiro grau são aquelas onde há um eritema doloroso decorrente da destruição parcial da epiderme, com permanência da integridade da membrana basal, e tende a se reparar em poucos dias. Nas queimaduras de segundo grau, há uma destruição da derme papilar, com a presença de eritema e bolhas, destruição da camada basal, mas com células epidérmicas ao redor de seus folículos. Cicatriza de modo deficiente em três a quatro semanas, ou não cicatriza, requerendo enxerto. As queimaduras de terceiro grau são aquelas em que há destruição total da epiderme e derme, com colorações marrons, brancas ou pretas, onde há ausência de bolhas e de sensibilidade. Nesta lesão, o tecido subcutâneo pode estar mais ou menos lesionado e sempre requerem enxerto (Latarjet, 1995).

As queimaduras possuem características que as diferem das outras lesões, como colonização por bactérias potencialmente patogênicas, presença de grande quantidade de tecido inviável e exsudação proeminente. Além disso, podem permanecer abertas por grande período de tempo, não oferecendo proteção contra colonização bacteriana no ambiente da ferida (Quinn et al., 1985).

As modalidades de tratamento não dependem somente da natureza da lesão, mas são também baseadas em considerações como idade e saúde geral do paciente. Avanços no tratamento têm contribuído significantemente para o decréscimo da mortalidade associada a queimaduras e o maior objetivo, agora, é alcançar a cobertura permanente da pele imediatamente, com bons resultados funcionais e estéticos (Balasubramani; Kumar; Babu, 2001).

A restauração da função protetora do tecido cutâneo é a chave para o sucesso do tratamento das vítimas de queimaduras com várias severidades de danos, de modo a prevenir infecções e, no caso de feridas extensas, deter a perda de fluidos (Balasubramani; Kumar;

Babu, 2001; Halim, 2010). Entretanto, devido a complicações associadas com a própria queimadura, outras lesões concomitantes de variada severidade podem estar presentes, incluindo obstrução de vias aéreas, danos aos pulmões (devido à inalação de fumaça), fraturas, lesões no cérebro ou coluna e hemorragia interna, inviabilizando a cobertura da ferida com a própria pele da vítima de queimadura (Quinn et al., 1985).

O autoenxerto tem sido reconhecido como o melhor curativo definitivo para as queimaduras, mas isto é dificultado pela limitação das fontes viáveis, como descrito acima, especialmente em queimaduras maiores. Assim, os substitutos de pele são representados por um heterogêneo grupo de materiais curativos que fecham a ferida e restauram as funções da pele, temporariamente ou permanentemente, a depender das características do produto. Estas substâncias são alternativas para a cobertura da ferida quando a terapia padrão não é possível (Halim, 2010).

2.4 A CELULOSE BACTERIANA E O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

A tendência atual dos cuidados com queimaduras tem sofrido modificações no sentido de alcançar não somente a sobrevivência do indivíduo, mas de melhorar, em longo prazo, a forma e a função da ferida cicatrizada e a qualidade de vida dos afetados (Halim, 2010). Com o objetivo de estimular e acelerar o processo de cicatrização de pacientes queimados e melhorar seus resultados funcionais e cosméticos, o campo dos substitutos de pele e curativos de feridas biossintéticos tem melhorado nos anos recentes e suas aplicações clínicas têm se tornado cada vez mais importante (Ramhmanian-Schuarz, 2011). Aliado a isso, com o progresso da biotecnologia e engenharia de tecidos, uma vasta gama de substitutos de pele para o tratamento de queimaduras estão agora disponíveis no mercado (Jones; Currie; Martin, 2002; Halim, 2010).

Para que um curativo temporário de ferida seja considerado adequado, ele deve apresentar algumas características: ser biocompatível, não tóxico e não pirogênico, capaz de oferecer barreiras contra infecção e perda de fluidos e de reduzir a dor durante o tratamento. Além disso, deve ser capaz de criar e manter um ambiente úmido na ferida, cobertura da ferida fácil e bem feita, permitir introdução e transferência de medicamentos para dentro da lesão, capaz de absorver exsudatos durante a fase de inflamação, possuir alta resistência mecânica, elasticidade e conformabilidade e permitir sua remoção fácil e indolor (Czaja, 2006).

Avanços recentes no campo dos biomateriais e suas aplicações médicas indicam a significância e potencial de vários polissacarídeos microbianos no desenvolvimento de uma nova classe de materiais curativos. Entre eles está a celulose bacteriana (CB), um polímero sintetizado em abundância por vários gêneros de bactérias, dentre essas as mais frequentemente estudadas são as da espécie *Acetobacter xylinum* (Petersen; Gatenholm, 2011). Embora quimicamente semelhante à celulose vegetal, a CB dispõe de singulares propriedades, determinadas pela genética particular do microorganismo, dentre elas uma estrutura nanofibrilar distinta que pode se tornar uma perfeita matriz para a cicatrização de feridas (Vandamme et al., 1998; Czaja, 2006; Petersen; Gatenholm, 2011).

Resultados tem mostrado que a topografia nanofibrilar tem um impacto positivo no comportamento celular, estimulando o processo de regeneração. Se o material é hidrofílico, então há vantagem adicional, pois propicia um ambiente úmido na ferida, o que é melhor para acelerar a migração das células epiteliais da borda para o centro da lesão. As nanofibras substituem elastina e fibras colágenas da MEC em termos de forma, tamanho e propriedades mecânicas, permitem drenagem de exsudatos, são permeáveis a gás e previnem contaminação da ferida. Adicionalmente, as nanofibras expressam uma maior flexibilidade e resistência mecânica em comparação com o mesmo material de outras formas e dimensões maiores (Petersen; Gatenholm, 2011; Rosic et al., 2013).

Por apresentar características nanomorfológicas, a celulose bacteriana resulta em um produto com grande capacidade de absorção de água e, ao mesmo tempo, dispõe de grande elasticidade, alta resistência, mesmo quando muito umidificada, e conformabilidade. O pequeno tamanho de suas fibras parece ser o ponto chave do seu desempenho como sistema de cura de feridas. Além do mais, a CB é um material que permite grande potencial de transferência de antibióticos ou outras substâncias terapêuticas para dentro das feridas, ao mesmo tempo em que serve como uma eficiente barreira física contra infecção externa. Essa celulose, produzida na forma de uma membrana gelatinosa, pode ser moldada dentro de qualquer contorno e tamanho durante sua síntese, dependendo das condições e técnica de fermentação usada. O presente *status* dos modernos sistemas de cura das feridas geralmente requer que os materiais usados como curativos criem um ambiente ótimo para a regeneração epidérmica, oferecendo uma barreira contra infecção e perda de fluidos (Czaja, 2006).

Atendendo a essas necessidades, a CB parece melhorar o crescimento de células da pele humana e já está em uso como substituto de pele por meio de uma marca comercializada e patenteada como BioFill[®], atualmente Nexfill[®] (Vandamme et al., 1998).

Além de suas características nanoestruturais, a biomembrana promove alívio da dor de modo imediato após sua aplicação, possui transparência que permite inspeção da ferida e promove menor tempo de hospitalização, bem como uma melhor qualidade de vida durante a recuperação dos afetados por queimaduras (Pecoraro et al., 2008).

2.5 LASER E FOTOBIOMODULAÇÃO

O uso terapêutico da luz remonta aos primórdios da civilização. Embora com eficácia de difícil julgamento, devido à baixa qualidade dos registros, há ao longo da história incontáveis relatos sobre a utilização da luz solar de forma terapêutica (Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

Atualmente, a grande aplicabilidade da energia luminosa de forma científica e tecnológica se deve ao raio laser, cuja origem é discutida. Foi Albert Einstein quem propiciou o seu desenvolvimento teórico e foram Schawlaw e Townes os autores dos princípios pelos quais todos os laseres operam. Entretanto, foi Maiman em 1960 que conseguiu, pela primeira vez, a emissão estimulada de radiação pela excitação de uma roda de rubi, o que resultou na geração do primeiro raio laser com emissão no espectro vermelho (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010). A palavra laser é o acrônimo da expressão *light amplification by stimulated emission of radiation*.

A geração do raio laser ocorre dentro de uma câmara em cujas extremidades estão posicionados dois espelhos cuja diferença da capacidade de reflexão permite a saída de radiação de dentro da cavidade, formando, assim, o raio laser (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010). Essa câmera possui um meio ativo que pode ser um gás, um cristal ou um material semicondutor em estado sólido. O meio ativo é que nomeia o tipo de laser. Os gases usados podem ser argônio e dióxido de carbono (CO_2). O restante são pastilhas semicondutoras em estado sólido feitas com múltiplas camadas de metais como gálio, alumínio, índio e arsênico. Ou podem ser hastes sólidas de cristal granada com várias

combinações de ítrio, alumínio, escândio e gálio e, em seguida, dopadas com crômio, neodímio ou érbio (Coluzzi, 2004).

A luz laser consiste em ondas que possuem um comprimento específico, que é a distância entre dois pontos correspondentes (picos ou vales) da onda sobre o eixo horizontal. A frequência é a quantidade total de ondas que passam por um determinado ponto durante o período de um segundo. Logo, quanto menor o comprimento de onda (λ), maior será a frequência do raio laser. À medida que o comprimento de onda diminui, a energia aumenta. Assim, laseres com menores comprimentos de onda são mais energéticos. Para o olho humano, comprimento de onda significa cor e apenas a porção do espectro das radiações que se situa entre 400 e 700 nm é visível ao olho humano (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

A luz laser apresenta como características a coerência, colimação, monocromaticidade, polarização e eficiência. Entretanto, a utilização desse tipo de energia deve levar em consideração importantes parâmetros como potência, densidade de potência, densidade de energia ou fluência, dose, diâmetro do raio, modo de emissão e sistemas e modos de entrega de forma a se potencializar os efeitos benéficos deste tipo de terapia (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

A potência do laser diz respeito à taxa de entrega de energia em joules por segundo e é medida normalmente em watts, da mesma forma que a luz doméstica convencional. A densidade de potência ou irradiância é a concentração fotônica em uma dada unidade de área e é descrita em watts por centímetro quadrado. Quando o raio laser é focado em determinado local, ocorre a concentração de energia nesse ponto, o que se relaciona diretamente ao comprimento da onda do raio e à distancia da lente ao foco. O aumento da distância focal implica no aumento do comprimento do raio, diminuindo a densidade da energia aplicada (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

Além dos parâmetros relacionados ao laser, devem ser consideradas as características inerentes ao tecido irradiado. Cada tecido apresenta propriedades ópticas que lhe são peculiares e vão determinar a extensão e a natureza da resposta tecidual que ocorre através dos processos de absorção, transmissão, reflexão e difusão da luz laser. Dessa forma, a quantidade de água e os cromóforos presentes nos tecidos, como células e organelas, hemoglobina, melanina, colágeno, vasos sanguíneos e linfáticos, assim como a estratificação

tecidual, como ocorre na pele, irão interferir na capacidade de absorção, reflexão ou difusão do raio laser (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

Por conseguirem levar uma grande quantidade de energia aos tecidos com extrema precisão, os laseres promovem alterações estruturais nos mesmos, que variam de acordo com a temperatura alcançada. Desse modo, os laseres são divididos em dois grandes grupos: os de alta potência ou cirúrgicos e os de baixa potência, terapêuticos ou não cirúrgicos. Essa tecnologia tem sido amplamente utilizada na área médica nas últimas décadas (Coluzzi, 2004; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

O aumento da temperatura é alcançado com a aplicação dos laseres de alta potência sobre o tecido, com finalidade de corte, coagulação e destruição tecidual seletiva. Os resultados da mudança estrutural do tecido, que dependem da temperatura alcançada, variam desde mudanças de conformação até a vaporização ou ablação (Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

Por outro lado, os efeitos não térmicos são alcançados com a aplicação dos laseres de baixa potência, que não alteram a temperatura tecidual, mas produzem efeitos fotoquímicos e fotofísicos que interferem nos processos biológicos. O principal resultado desses efeitos, descritos por diversos trabalhos na literatura, é o incremento do ATP mitocondrial, que favorece um grande numero de reações que interferem no metabolismo celular. Os efeitos biológicos incitados pela ação do laser sobre os tecidos, não resultantes de aquecimento tecidual, são denominados fotobiomodulação (Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010).

O primeiro uso do laser na fotobiomodulação remonta à década de 1960 com o laser de HeNe, que foi o primeiro laser comercialmente viável (Karu; Kolyakov, 2005). Embora os mecanismos biológicos do efeito estimulante do laser não tenham sido completamente entendidos, numerosos estudos experimentais e clínicos sugerem que o laser modula os processos metabólicos levando a uma potencial melhora regenerativa dos tecidos (Stein et al., 2008). No organismo humano, tem sido apontado que o fotoaceptor para estimulação do metabolismo celular é a enzima terminal da cadeia respiratória citocromo C oxidase (Karu; Kolyakov, 2005; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010; Prindeze; Moffatt; Shupp, 2012).

Segundo trabalhos consultados (Wong-Riley, 2005; Gao; Xing, 2009), a absorção das luzes vermelha e infravermelha pelos componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias resulta em aumento das espécies reativas ao oxigênio e ATP mitocondrial e inicia uma cascata

25

de sinalização com expressão de fatores de crescimento e citocinas, síntese de proteínas, que podem, por fim, levar à proliferação celular e citoproteção (Gao; Xing, 2009).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados com o objetivo de investigar e confirmar os efeitos fotobiomoduladores. Dentre os três principais efeitos benéficos deste tipo de radiação estão os efeitos analgésico, anti-inflamatório e de cicatrização de feridas (Bensadoun; Nair, 2012) através de sua ação na rede vascular (Ñunez et al., 2004; Ñunez et al., 2012).

Dentre os eventos biológicos encontrados estão proliferação de miofibroblastos nos estágios iniciais do reparo (Ribeiro et al., 2009); aceleração do reparo, com aumento da formação do tecido de granulação e angiogênese (Meireles et al., 2008); modulação da proliferação fibroblástica (Rocha Junior et al., 2006; Meireles et al., 2008); aumento da deposição de colágeno (Meireles et al., 2008; Marchionni et al., 2010; Martu et al., 2012); diferenciação e proliferação de osteoblastos (Stein et al., 2005); aceleração do reparo ósseo (Merli et al., 2005); aceleração da remodelação da ferida (Ñunez et al., 2012); aumento da síntese de TGF- β por fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias (Rocha Júnior et al., 2009); aumento da atividade mitocondrial no início do reparo (Crisan et al., 2012); liberação de fatores de crescimento (Meireles et al., 2008) e diminuição do infiltrado inflamatório (Martu et al., 2012).

A despeito da grande quantidade de estudos experimentais comprovando a eficiência do laser no processo de reparo tecidual (Lins et al., 2011), ainda existem controvérsias na literatura. Existem diversas razões para isso, dentre elas diferenças entre os tipos celulares componentes dos tecidos (Demidova-Rice et al., 2007), diferenças nas desordens das feridas, presença de diferentes bactérias, diferentes tipos de laseres, falhas metodológicas nos estudos experimentais e clínicos (Lins et al., 2011; Bensadoun; Nair, 2012), bem como grande variedade de parâmetros envolvidos nesta terapia, como comprimento de onda, fluência, coerência, onda contínua ou pulsátil, duração e propriedades ópticas dos tecidos (Ñunez et al., 2004; Demidova-Rice et al., 2007; Peplow; Chug; Baxter 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a dinâmica de formação da matriz extracelular no processo de reparo de queimaduras de segundo grau tratadas com a laserterapia com laser de fosfeto de índio-gálioalumínio (AlGaInP) associada ou não à membrana de celulose (NEXFILL[®]).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar e comparar a dinâmica de deposição dos colágenos tipos I e III no processo de reparo de queimaduras de segundo grau tratadas com a laserterapia com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (AlGaInP) (λ 660nm, 20J/cm², 40mW, Ø = 4mm, t=125s) associada ou não à membrana de celulose (NEXFILL[®]).

- Estudar a dinâmica de deposição de fibronectina no processo de reparo de queimaduras de segundo grau tratadas com a laserterapia com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (AlGaInP) (λ 660nm, 20J/cm², 40mW, Ø = 4mm, t=125s) associada ou não à membrana de celulose (NEXFILL[®]).

- Estudar a dinâmica de deposição de laminina no processo de reparo de queimaduras de segundo grau tratadas com a laserterapia com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (AlGaInP) (λ 660nm, 20J/cm², 40mW, Ø = 4mm, t=125s) associada ou não à membrana de celulose (NEXFILL[®]).

4 MÉTODOS

4.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Quarenta e oito espécimes obtidos a partir de um modelo de queimadura de segundo grau em ratos brancos da espécie *Rattus norvegiccus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, oriundos do banco de amostras do Grupo de Biopatologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ, Bahia), constituíram nosso grupo de estudo. Cabe ressaltar que o protocolo para obtenção das queimaduras (Anexo A) e a análise dos aspectos morfológicos (Anexo B) foram parte da Dissertação de Mestrado de Manuela Pimentel Noia, sob a supervisão do Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos. A distribuição dos animais, por grupo, encontra-se na tabela 1.

Grupo	Grupo Tratamento Tempo de morte		n	n total	
	não tratados	24 h	3		
Controlo		3 Dias	3	12	
Controle		7 Dias	3	12	
		14 Dias	3		
		24 h	3		
т	Laser	3 Dias	3	10	
1		7 Dias	3	12	
		14 Dias	3		
	Membrana	24 h	3		
н		3 Dias	3	12	
11		7 Dias	3		
		14 Dias	3		
	Laser + Membrana		24 h	3	
		3 Dias	3	10	
111		7 Dias	3	12	
		14 Dias	3		

Tabela 1- Distribuição dos animais por grupo experimental. Salvador, Bahia, 2014.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Nesta pesquisa foram utilizados espécimes parafinizados, oriundos do processo de experimentação animal cuja realização havia sido previamente aprovada pelo Comitê de Experimentação e Uso Animal (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ – BA), sob protocolo 008/2007. Foram seguidos os princípios éticos da experimentação animal, bem como a prática didático-científica da vivissecção destes, conforme descrição no anexo A.

4.3 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A partir da seleção dos blocos de parafina, foram obtidos cortes histológicos de cada bloco, com 4µm de espessura. Os cortes processados para a imuno-histoquímica foram colocados em lâminas de vidro previamente limpas, desengorduradas e silanizadas com trietoxi-silano a 1%. Todos os casos foram submetidos à imuno-histoquímica para investigação da marcação das proteínas fibronectina, laminina, colágeno I e colágeno III de acordo com o protocolo de imuno-histoquímica do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (LPBM-CPqGM-FIOCRUZ). Os fabricantes, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação estão descritos na tabela 2.

Para a desparafinização, as lâminas foram mergulhadas por 40 minutos em xilol PA (20 minutos xilol I e 20 minutos xilol II). Posteriormente, os cortes foram hidratados em dois banhos em álcool PA por 5 minutos cada com posterior imersão em água destilada. Os cortes histológicos foram demarcados com caneta hidrofóbica (Dako Pen, Dako, Glostrup, DEN).

A recuperação antigênica foi feita de acordo com a tabela 2. Logo após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 10% (90ml de água destilada e 10ml de peróxido de hidrogênio PA) em câmara escura por 10 minutos, os cortes foram lavados com água destilada e, em seguida foi aplicado o tampão Tris-HCL- BSA 1% por 5 minutos, Tris-HCL-Triton por 5 minutos e água destilada por 5 minutos.

Com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas para os anticorpos, foi realizado o bloqueio das proteínas com solução de leite em pó a 10% (10ml de água destilada e 1g de leite desnatado Molico/Nestlé) por 10 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos em solução diluente de anticorpo contendo proteínas redutoras de *background* (Antibody Diluent, Dako, Glostrup, DEN) e incubados sobre os cortes pelos tempos descritos na tabela 2.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com solução de Tris-HCL- BSA 1% por 5 minutos, objetivando a remoção dos anticorpos que não se ligaram aos epítopos. Posteriormente, foi aplicado um *pool* de imunoglobulinas IgG anti-rabbit/anti-mouse (Polímero EnVision Dual Link, DakoCytomation - USA) por 30 minutos e nova lavagem com Tris-HCL- BSA 1% por 5 minutos por duas vezes.

A revelação das reações foi feita com substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidina (liquid DAB+ substrate, Chromogen System, DakoCytomation – USA) por 5 minutos, em câmara escura. Após lavagem abundante com água destilada para remoção do excesso de cromógeno, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 60 segundos e lavados duas vezes com água destilada.

Finalmente, seguiu-se à desidratação dos cortes através de imersão por duas vezes em álcool PA e diafanização em xilol. A montagem das lâminas foi realizada com lamínulas e Bálsamo do Canadá natural. O controle positivo das reações foi interno, através da observação de áreas de tecido preservado adjacente à ferida. Para controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por tampão TRIS-HCL-/BSA 1%.

					Tempo de
Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	incubação
Fibronectina	Policlonal	Abcam	1:1000	SEM RECUPERAÇÃO	20'
Laminina	Policlonal	Dako	1:100	Tripsina 1% 30' A 37°C	1h
Colágeno I	5D8	Abbiotec	1:400	Tripsina 1% 30' A 37°C	1h
Colágeno III	Policlonal	Abbiotec	1:300	Tripsina 1% 30' A 37°C	1h

Tabela 2 – Clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos. Salvador, Bahia, 2014.

4.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos foram analisados de forma cega por uma patologista experiente, através de microscopia de luz e comparando todos os grupos que receberam tratamento com o grupo controle (animais não tratados), com exceção dos animais que foram mortos às 24 horas do experimento. Os colágenos I e III foram analisados quanto ao percentual de preenchimento da ferida, considerando apenas a derme papilar (escore 0: 0-10% de preenchimento; escore 1: 11-30%; escore 2: de 31 a 60% e escore 3: >60%) e quanto ao padrão das fibras (reticular, fibrilar ou misto). As fibras foram consideradas reticulares quando se apresentavam apenas parcialmente marcadas e fibrilares quando se apresentaram marcadas em toda a sua extensão.

Para a proteína fibronectina, a análise foi feita utilizando os seguintes critérios: presença da proteína subjacente à membrana basal epitelial e distribuição na derme papilar, nos padrões focal e dispersa, percentual de preenchimento da ferida (escore 1: até 30%, escore 2: de 31 a 60% e escore 3: >60% da ferida preenchida) e padrão das fibras (reticular, fibrilar ou misto). Para esta proteína, também foram considerados os animais a partir de três dias.

A laminina foi analisada de acordo com sua localização na membrana basal subepitelial ou membrana basal vascular. Os critérios aplicados para ambas as marcações foram: percentual de marcação (\leq 50% e >50%), continuidade (contínua e descontínua) e espessura (delgada, espessa ou mista).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram compilados em planilhas do programa ExcelTM (Microsoft) e, em seguida, transferidos para o Graph Pad Prisma versão 5.0, Software Inc (La Jolla, Califórnia, USA). Para comparação e avaliação das diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, foi aplicado o teste não paramétrico de Fisher, considerando o valor de p<0.05.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.1.1 Três dias

Neste tempo, em relação ao colágeno III, o grupo controle apresentou dois animais com escore 2 e uma animal com escore 3. O grupo I apresentou composição com 3 escores: 0, 1 e 2. O grupo II teve dois animais com escore 0 e um com escore 3. O grupo III teve dois animais com escore 0 e um com escore 2. Quando houve marcação acima de 10% para essa proteína, o padrão predominante foi o misto (fibras reticulares e fibrilares), exceto para o grupo controle, que apresentou dois animais com padrão reticular.

Para o colágeno I, o grupo controle teve um animal com cada escore: 0, 1 e 2. O grupo I teve dois animais com escore 1 e um animal com escore 0. Os grupos II e III tiveram comportamento semelhante nesse tempo: dois animais com escore 0 e um animal com escore 1. Em relação ao padrão das fibras, dois animais tiveram padrão misto no grupo controle, e um animal com esse padrão nos grupos I, II e III. Os outros espécimes desses últimos grupos não foram avaliados quanto ao padrão das fibras, devido à baixa deposição de colágeno I. A distribuição temporal dos colágenos III e I, em cada grupo experimental, está representada na figura 1 e os aspectos da expressão imuno-histoquímica representados nas figuras 4 e 5.

A fibronectina foi identificada adjacente à membrana basal subepitelial em todos os animais de todos os grupos aos três dias, porém essa marcação se apresentou de modo descontínuo em todos os animais (n=3) dos grupos II e III, contra n=2 nos grupos controle e I com essa marcação. Na MEC, a fibronectina estava distribuída de modo disperso em todos os espécimes dos grupos controle, I e II. O grupo III foi o único que apresentou um representante com distribuição focal (n=1). O grupo II foi o que apresentou o menor escore de preenchimento (escore 1) pela fibronectina na MEC: n=3. Os outros grupos apresentaram escore 2 na maioria dos seus espécimes. O grupo II apresentou n=3 com padrão reticular, contra n=2 do controle. Os grupos I e III tiveram padrão misto das fibras. Os aspectos da expressão imuno-histoquímica para esta proteína estão representados na Figura 6.

A laminina mostrou-se presente em mais de 50% da extensão da lamina basal subepitelial em todos os animais aos três dias. Mas se apresentou contínua na maioria do grupo controle e III e descontínua na maioria dos animais dos grupos I e II. Quando o critério avaliado foi espessura, todos os animais (n=3) dos grupos controle, I e II tiveram marcação mista, contra n=2 do grupo III com marcação espessa (Figura 7).

5.1.2 Sete dias

No sétimo dia experimental, os grupos controle e II apresentaram dois animais com escore 1 para o colágeno III e um animal com escore 2 e 3, respectivamente. O grupo I teve n=3 com escore 0 e o grupo III teve dois animais com escore 0. Quanto ao padrão, este foi variável entre os grupos. O grupo controle apresentou n=2 com padrão misto e um com reticular. O grupo II apresentou n=2 com fibrilar e um com reticular.

Quanto ao colágeno I, todos os grupos apresentaram aumento da deposição dessa proteína nesse tempo experimental. O grupo controle teve espécimes com escores 1, 2 e 3. O grupo I apresentou n=2 com escore 2 e um com escore 3. O grupo II teve n=2 com escore 1 e um com escore 3, de modo inverso ao grupo III, que teve n=2 com escore 3 e um com escore 1. Quanto ao padrão, este foi predominantemente misto nos grupos controle, I e II com n=2. O grupo III teve n=2 com padrão fibrilar. Entretanto, houve uma tendência de modificação do padrão de misto para fibrilar a partir deste tempo experimental. A distribuição temporal dos colágenos III e I, em cada grupo experimental, está representada na figura 1 e os aspectos da expressão imuno-histoquímica representados nas figuras 4 e 5.

A fibronectina apresentou marcação descontínua subjacente ao epitélio na maioria dos espécimes de todos os grupos aos sete dias, assim como prevaleceu a distribuição dispersa da fibronectina na derme papilar. A melhor taxa de preenchimento foi verificada no grupo controle (n=2 com escore 3) e o pior escore foi verificado no grupo II (n=2 com escore 1). Os grupos I e III apresentaram a maioria com escore 2. O padrão foi misto na maioria dos animais (n=2) dos grupos controle e I e reticular na maioria dos animais dos grupos II e III. Os aspectos da expressão imuno-histoquímica para esta proteína estão representados na figura 6.

A laminina mostrou-se presente em mais de 50% da extensão da lamina basal subepitelial em todos os animais no sétimo dia. Essa marcação foi contínua em todos os animais dos grupos controle, II e III. Contudo, foi descontínua em todos os animais do grupo tratado com laser (grupo I). Prevaleceu o padrão misto nos grupos controle e I, contra o padrão espesso nos grupos II e III (Figura 7).

5.1.3 Catorze dias

Todos os grupos apresentaram aumento da deposição de colágeno III neste tempo experimental. O grupo controle apresentou n=2 com escore 3 e um animal com escore 2. O grupo I teve n=2 com escore 2 e um com escore 1. O grupo II teve n=2 com escore 3 e um com escore 1. O grupo III teve todos os seus espécimes com escore 3. Em relação ao padrão, este oscilou entre misto e fibrilar nesse tempo experimental, sendo que o grupo II apresentou n=3 com padrão fibrilar.

De modo semelhante ao colágeno III, todos os grupos apresentaram aumento da deposição do colágeno I no 14° dia, sendo que todos os espécimes dos grupos controle, I e III tiveram o escore 3 de preenchimento. Somente o grupo II teve n=1 com escore 3 e n=2 com escore 2. Quanto ao padrão, este foi fibrilar em todos os animais dos grupos controle, I e III e em dois animais do grupo II.

Aos 14 dias, a fibronectina subjacente à membrana basal subepitelial estava descontínua em n=2 do grupo controle e em todos os animais dos grupos I e II. Porém no grupo III, n=2 animais demonstraram marcação contínua. A distribuição foi dispersa em todos os animais avaliados. Quanto ao escore de preenchimento na derme papilar, este foi muito variado entre os grupos, mas somente o grupo I apresentou n=2 animais com o escore mais baixo de preenchimento (0-30%). O padrão prevalente foi o misto em todos os grupos, exceto no grupo I, onde prevaleceu o padrão reticular. Os aspectos da expressão imuno-histoquímica para esta proteína estão representados na figura 6.

Neste tempo experimental, todos os grupos evoluíram com a marcação contínua e acima de 50% da laminina em membrana basal epitelial, com espessura mista em n=2 animais

dos grupos controle, I e III. A distribuição da laminina na membrana basal subepitelial em todos os grupos, independente do tempo experimental, pode ser visualizada na tabela 3.

Grupos	Controle n (%)	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)	Grupo III n (%)
% de marcação				
≤ 50%	-	1 (11)	-	-
> 50%	9 (100)	8 (89)	9 (100)	9 (100)
Continuidade				
Contínua	7 (78)	3 (33,3)	6 (66,6)	9 (74,7)
Descontínua	2 (22)	6 (66,6)	3 (33,3)	-
Espessura				
Delgada	1 (11)	1 (11)	-	-
Espessa	-	-	4 (44,4)	5 (55,5)
Mista	8 (89)	8 (89)	5 (55,5)	4 (44,4)

Tabela 3 – Percentual de marcação, continuidade e espessura da laminina na membrana basal subepitelial. Salvador, Bahia, 2014.

A marcação da laminina na membrana basal dos vasos foi semelhante em todos os grupos em todos os tempos experimentais: >50%, contínua e espessa, conforme pode ser visualizado na tabela 4.

Tabela 4 – Percentual de marcação, continuidade e espessura da laminina na membrana basal vascular. Salvador, Bahia, 2014.

Grupos	Controle n (%)	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)	Grupo III n (%)
% de marcação				
≤ 50%	-	-	-	-
> 50%	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)
Continuidade				
Contínua	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)
Descontínua	-	-	-	-
Espessura				
Delgada	-	-	-	-
Espessa	7 (78)	9 (100)	9 (100)	9 (100)
Mista	2 (22)	-	-	-

35

A marcação da fibronectina subjacente à lamina basal subepitelial e na MEC, em todos os grupos experimentais, independente dos tempos de morte dos animais, pode ser visualizada na tabela 5.

Grupos	Controle n (%)	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)	Grupo III n (%)		
Membrana Basal						
Localização						
Subepitelial	8 (89)	7 (78)	8* (89)	8 (89)		
Vascular	-	-	-	-		
Ambas	1 (11)	2 (22,2)	-	1 (11)		
Continuidade						
Contínua	3 (33,3)	2 (22,2)	-	2 (22,2)		
Descontínua	6 (67)	7 (78)	8* (89)	7 (78)		
	Ma	triz Extracelular				
Localização						
Focal	1 (11)	-	-	1 (11)		
Dispersa	8 (89)	9 (100)	9 (100)	8 (89)		
% de preenchimento						
0-30%	1 (11)	3 (33,3)	5 (55,5)	2 (22,2)		
31-60%	5 (55,5)	3 (33,3)	4 (44,4)	5 (55,5)		
>60%	3 (33,3)	3 (33,3)	-	2 (22,2)		
Padrão						
Reticular	3 (33,3)	4 (44,4)	5 (55 <i>,</i> 5)	2 (22,2)		
Fibrilar	-	-	-	-		
Misto	6 (67)	5 (55,5)	4 (44,4)	7 (78)		

Tabela 5 – Distribuição da fibronectina subjacente à membrana basal epitelial e na MEC. Salvador, Bahia, 2014.

*um animal foi desconsiderado nesse grupo, em relação a esse parâmetro.

Por fim, a distribuição dos colágenos tipos I e III foi comparada entre os grupos de acordo com os tempos experimentais (Figura 1).



Figura 1: Distribuição dos colágenos I e III nos grupos experimentais, de acordo com os tempos de morte dos animais.

Os grupos também foram estatisticamente comparados independentemente do tempo experimental e observou-se maior quantidade de colágeno tipo III nos grupos controle, II e III, quando comparados ao grupo I (p<0.05). Em relação ao colágeno tipo I, os grupos I e III apresentaram uma maior deposição dessa proteína em relação ao grupo II e esta diferença foi estatisticamente significante (p<0.05). Porém não houve diferença estatisticamente significante na deposição do colágeno I entre os grupos I e III e o grupo controle, como pode ser observado na figura 2.

Além disso, um maior preenchimento por fibronectina foi descrito para o grupo III quando comparado ao grupo II (p<0.05). A comparação entre os grupos experimentais, independente do tempo de morte, está descrita na figura 2.



Figura 2: Comparação dos escores dos colágenos III e I e fibronectina entre os grupos experimentais, independente dos tempos experimentais.

Quanto ao padrão de marcação da laminina na lâmina basal subepitelial, o grupo I se mostrou com um padrão de descontinuidade e esse resultado foi significante quando esse grupo foi comparado com os grupos controle, II e III (p<0.05), como pode ser visualizado na figura 3.



Figura 3: Comparação do padrão de continuidade da laminina na lâmina basal subepitelial entre os grupos, independente dos tempos experimentais.

Figura 4: Imunodetecção do colágeno III. Todos os grupos apresentaram evolução da deposição de colágeno tipo III, contudo o grupo I (laser) apresentou a menor deposição dessa proteína em todos os tempos experimentais (p<0.05). **A**: grupo controle três dias; **B**: grupo controle sete dias; **C**: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **H**: grupo II sete dias; **I**: grupo II 14 dias; **J**: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **K**: grupo III sete dias; **L**: grupo III 14 dias; **D**: grupo III três dias; **H**: grupo II sete dias; **I**: grupo II 14 dias; **J**: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **K**: grupo III sete dias; **L**: grupo III 14 dias. Observa-se um maior paralelismo entre as fibras no 14° dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens – Original, HRP, 40X.

COLÁGENO III



Figura 5: Imunodetecção do colágeno I. Os grupos experimentais apresentaram evolução da deposição de colágeno tipo I de modo semelhante ao grupo controle. **A**: grupo controle três dias; **B**: grupo controle sete dias; **C**: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **H**: grupo II sete dias; **I**: grupo II 14 dias; **J**: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **K**: grupo III sete dias; **L**: grupo III 14 dias. Observa-se um maior paralelismo entre as fibras no 14° dia em todos os grupos experimentais. Todas as imagens – Original, HRP, 40X.

COLÁGENO I



Figura 6: Imunodetecção da fibronectina. O grupo II apresentou menor deposição de fibronectina quando comparado aos outros grupos (p<0.05). **A**: grupo controle três dias; **B**: grupo controle sete dias; **C**: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **H**: grupo II sete dias; **I**: grupo II 14 dias; **J**: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **K**: grupo III sete dias; **L**: grupo III 14 dias; **L**: grupo III 14 dias. Todas as imagens – Original, HRP, 40X.

FIBRONECTINA



Figura 7: Imunodetecção da laminina. O grupo I (laser) apresentou significante marcação descontínua da lâmina basal subepitelial quando comparado aos outros grupos experimentais (p<0.05). **A**: grupo controle três dias; **B**: grupo controle sete dias; **C**: grupo controle 14 dias; **D**: grupo I (laser) três dias; **E**: grupo I sete dias; **F**: grupo I 14 dias; **G**: grupo II (biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **H**: grupo II sete dias; **I**: grupo II 14 dias; **J**: grupo III (laser associado à biomembrana de celulose Nexfill[®]) três dias; **K**: grupo III sete dias; **L**: grupo III 14 dias. Todas as imagens – Original, HRP, 40X.

LAMININA



6 DISCUSSÃO

A utilização do laser de forma terapêutica tem sido motivo de diversos estudos experimentais e clínicos nas últimas décadas (Anneroth et al., 1988; Hall et al., 1994; Schaler et al., 2000; Merli et al., 2005; Stein et al., 2005; Rocha Junior et al., 2006; Meireles et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Martu et al., 2012; Ñunez et al., 2012; Crisan et al., 2012). O maior objetivo das pesquisas sobre a fotobiomodulação é confirmar a sua influência nos eventos biológicos como angiogênese (Ñunez et al., 2004; Meireles et al., 2008) e tempo de reparo de lesões de pele, feridas crônicas (Al-Watban et al., 2007) e queimaduras (Meireles et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Fiório et al., 2013).

Neste estudo, foi avaliado se a terapia com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio de λ = 660nm, associada ou não ao uso da membrana de celulose NEXFILL[®], poderia melhorar a cicatrização de queimaduras de segundo grau em um modelo animal. Para essa análise, foi realizada a técnica imuno-histoquímica a fim de avaliar a formação de matriz extracelular através da deposição de proteínas matriciais que desempenham papéis fundamentais no processo de reparo da pele: colágeno tipo III, colágeno tipo I, fibronectina e laminina.

O estudo do comportamento fisiopatológico das queimaduras representa, até o presente momento, um grande desafio no que diz respeito ao estabelecimento de modelos experimentais de indução que consigam reproduzir de forma fidedigna o comportamento dessa agressão. Embora não seja o padrão ouro para um estudo dessa natureza, o baixo custo e a facilidade de manipulação dos ratos e camundongos compõem o modelo animal mais amplamente empregado para esse fim (Schaler et al., 2000; Bayat et al., 2005; Meireles et al., 2008)

A descrição dos efeitos da laserterapia sobre os tecidos, denominada fotobiomodulação, tem sido dificultada pela não uniformidade dos parâmetros experimentais e variação nas análises. No que tange à aplicação desse tipo de energia luminosa de forma terapêutica, existe uma grande variedade de trabalhos que utilizaram diferentes densidades de energia (Pugliese et al., 2003; Bayat et al., 2005; Fiório et al., 2013; Novaes et al., 2013), comprimentos de onda (Al-Watban et al., 2007; Guirro et al., 2010; Crisan et al., 2012), doses (Al-Watban; Delgado, 2005; Al-Watban et al., 2007; Guirro et al., 2010b) e diferentes intervalos de aplicação (Bayat et al., 2005; Ñunez et al., 2012).

Recentemente, AlGhamdi et al. (2012) revisaram estudos publicados entre 1923 e 2010 que utilizaram o laser com o objetivo de estimular a proliferação de células em cultura. Segundo esses autores, o laser aumenta a produção de ATP, síntese de RNA e DNA, melhorando a proliferação celular sem, no entanto, causar efeitos citotóxicos. Ainda segundo essa revisão, os resultados variam de acordo com a densidade de energia aplicada e com os comprimentos de onda aos quais as células são submetidas. Esta análise sugere que um valor de densidade de energia de 0,5 a 4,0 J/cm² e um espectro visível entre λ = 600 a 700nm são muito úteis para melhorar a taxa de proliferação de várias linhas celulares.

Além do comprimento de onda e dose, características ópticas dos tecidos também são relevantes em relação à interação entre as células e irradiação por laser, pois fatores como composição do tecido, pigmentação e conteúdo de água irão interferir na absorção (Coluzzi, 2004; Ribeiro et al., 2009; Pinheiro; Brugnera Júnior; Zanin, 2010). Cromóforos presentes nos tecidos como a melanina, adenina, hemoglobina e proteínas, apresentam-se mais ressonantes com a radiação laser emitida no espectro da luz vermelha (Poli, 2006).

Com base nesses aspectos, optou-se, neste estudo, pela utilização do laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio, o qual emite radiação com λ =660nm. Portanto, um laser altamente interativo com os tecidos que participam do processo de reparo epitelial.

Na etapa anterior deste projeto, cujo objetivo foi avaliar os aspectos morfológicos teciduais nos grupos experimentais (Controle, Laser, Membrana de Biocelulose NEXFILL[®] e Laser em associação com a Membrana de Biocelulose NEXFILL[®]), os resultados demonstraram que não houve interferência da ação do laser isoladamente na aceleração do reparo das lesões de queimaduras induzidas no dorso dos ratos, inclusive o grupo I (Laser) apresentou infiltrado inflamatório intenso predominante, principalmente a partir do sétimo dia experimental (Anexo B) (Noia, 2009).

A mensuração da profundidade da queimadura é uma medida inexata. Entretanto, a sua determinação clínica é necessária para a indicação do tratamento correto e previsão do tempo de cura (Watts et al., 2001). Nas queimaduras de segundo grau, há uma destruição parcial da derme, com a presença de eritema e bolhas, destruição da camada basal, mas com células epidérmicas ao redor de seus folículos (Latarjet, 1995). Em nosso estudo, a lesão de queimadura foi realizada levando-se em consideração recomendações do fabricante da membrana de celulose microbiana NEXFILL[®], que restringe o uso do material a lesões superficiais que não ultrapassem, em profundidade, os anexos cutâneos (Noia, 2009). Dessa

forma, a reprodução de um modelo queimadura de segundo grau com destruição da epiderme e da derme papilar foi confirmada mediante avaliação histológica nos ensaios pilotos (Noia, 2009).

A obtenção do modelo de queimadura do presente trabalho se assemelha ao protocolo usado por Bayat et al. (2005), para obtenção da queimadura de segundo grau. Entretanto há trabalhos na literatura que reproduziram queimaduras de terceiro grau em seus experimentos (Meirelles et al., 2008; Ñunez et al., 2012; Moraes et al., 2013) enquanto há pesquisas que não fazem referência alguma à profundidade da lesão infligida (Schaler et al., 2000; Al-Watban; Delgado, 2005; Dantas et al., 2011). Essa variedade nas metodologias empregadas contribui para a dificuldade em encontrar resultados comparáveis e reprodutíveis entre os trabalhos.

Tradicionalmente, a avaliação do colágeno tipo I e tipo III fornece um importante indicador da progressão do processo de cura, uma vez que nas fases iniciais do reparo a síntese de colágeno tipo III predomina e é então substituída gradualmente por fibras colágenas do tipo I, mais espessas, resistentes e predominantes no tecido normal (Gantwerker; Hom, 2012). Assim, determinar a proporção de fibras de colágeno tipo I em relação ao tipo III permite avaliar o nível de remodelação e maturação do tecido reparado, o que por sua vez indica o quanto este tecido se aproxima do tecido normal tanto histológica quanto funcionalmente. Considerando essas características, sabe-se que as abordagens terapêuticas que estimulam a síntese de colágeno do tipo I, o que conduz a um aumento na maturação do tecido reparado, são estratégias potencialmente úteis no tratamento de lesões da pele (Medrado et al., 2003; Pugliese et al., 2003; Liu et al., 2008).

No presente estudo, os grupos que receberam a terapia com laser isoladamente ou em associação com a membrana de biocelulose NEXFILL[®] foram os que apresentaram a menor deposição de colágeno tipo III no sétimo dia do experimento. Com a evolução do processo de reparo, houve tendência de aumento da deposição de colágeno III, com aumento dos escores para todos os grupos. Entretanto, enquanto os grupos controle, II e III apresentaram escore 3 em dois ou três animais, o grupo I (laser) não apresentou nenhum animal com esse escore, e esse resultado foi estatisticamente significante (p<0.05) na comparação com os outros grupos. Esse resultado acompanha a tendência verificada por Noia (2009), segundo a qual houve presença de infiltrado inflamatório graduado como intenso no sétimo dia experimental, o que pode estar relacionado ao resultado verificado com a imuno-histoquímica.

Em relação ao colágeno tipo I, todos os grupos se comportaram de modo semelhante, pois houve evolução em relação à deposição do colágeno I à medida que o processo de reparo evoluiu. Enquanto no terceiro dia do experimento poucos animais chegavam a apresentar escore 1, aos 14 dias todos os animais dos grupos controle, I e III apresentaram escore 3 para o colágeno I, contra apenas um animal com esse escore no grupo II. Quando o grupo II foi comparado aos outros, independente do tempo experimental, ele se mostrou com uma deposição de colágeno I significantemente menor (p<0.05). Apesar disso, os grupos I e III não apresentaram diferenças na deposição do colágeno I, quando comparados ao controle. O padrão das fibras também sofreu modificação do padrão misto (reticular e fibrilar) para um padrão puramente fibrilar, em todos os grupos, demonstrando o preenchimento da ferida com fibras colágenas mais espessas.

Esses resultados sugerem que não houve influência positiva das terapias aplicadas na deposição dos colágenos tipos I e III. Inclusive, a avaliação dos resultados quanto ao colágeno III aponta para uma interferência negativa do laser no sétimo dia experimental. Esses achados concordam com outros autores que não encontraram diferenças histológicas no processo de reparo de lesões quando o laser foi utilizado de forma terapêutica (Anneroth et al., 1988; Hall et al., 1994; Schaler et al., 2000; Al-Watban; Delgado, 2005; Bayat et al., 2005).

Embora os parâmetros de irradiação utilizados no presente trabalho tenham sido baseados em pesquisas que obtiveram resultados positivos quando da aplicação do laser no reparo de queimaduras de terceiro grau (Meirelles et al., 2008) ou feridas cutâneas em animais desnutridos (Pinheiro et al., 2004), neste estudo não foram verificados efeitos positivos da laserterapia nas queimaduras de segundo grau induzidas em ratos utilizando tais parâmetros.

AlGhamdi et al. (2012) sugeriram uma densidade de energia entre 0,5 e 4 J/cm² como úteis para o aumento da taxa de proliferação de células em cultura. Segundo Pinheiro et al. (2010), quando a luz laser incide em monocamadas de células em cultura, a conservação da polaridade e da coerência podem ser determinantes nos resultados biológicos, ocorrendo o mesmo ao se irradiar uma úlcera. Dessa forma, doses mais baixas de irradiação devem ser aplicadas em mucosas, úlceras ou feridas, diferentemente da pele íntegra, devido à estratificação. Em uma ampla revisão de trabalhos sobre fotobiomodulação, Tuner e Hode (1998) descreveram uma densidade de energia entre 1 e 4 J/cm² como a mais indicada no reparo de feridas, sob o risco de o laser exercer um efeito inibitório no processo de reparo. Nussbaum et al. (2009) trataram feridas cutâneas em ratos com laser vermelho (635 nm) nas fluências de 1 e 20 J/cm². Foi avaliado o potencial bactericida do laser, assim como a aceleração da atividade tecidual. As feridas irradiadas com 1 J/cm² cicatrizaram da mesma forma que os controles. As que foram irradiadas com 20 J/cm² cicatrizaram piores que os controles no terceiro dia. Com esta mesma dose de energia, os autores observaram um retardo no fechamento da ferida no dia 19. Al-Watban e colaboradores (2007) avaliaram quatro comprimentos de onda e quatro doses diferentes e concluíram que doses a partir de 20 J/cm² levaram às menores taxas de cicatrização na maioria dos comprimentos de onda avaliados.

Baseado nesses aspectos é possível que a densidade de energia total de 20 J/cm² utilizada no presente estudo, que poderia ter sido potencialmente benéfica em outras condições, se revelou como uma quantidade excessiva de energia, ocasionando sobrecarga às células e potencializando o processo inflamatório.

Por outro lado, a divergência na literatura é marcante e pode-se encontrar trabalhos que obtiveram resultados positivos com baixas densidades de energia como 4 J/cm² (Pugliese et al., 2003), 1-4 J/cm² (Ñunez et al., 2012), 3,8 J/cm² (Rocha Junior et al., 2009) e 5,5 J/cm² (Crisan et al., 2012) bem como há autores que utilizaram duas densidades de energia diferentes de 3 e 30 J/cm² e obtiveram resultados positivos com a aplicação dos dois parâmetros (Novaes et al., 2013).

De modo geral, em todos os tempos experimentais e para todos os grupos houve um maior escore de deposição para o colágeno I em relação ao III. A substituição do colágeno tipo III pelo tipo I e a mudança do padrão das fibras, que se tornaram mais espessas (fibrilares) no último dia do experimento, são indicadores de organização, maturação e força tênsil da área cicatrizada e aconteceu em todos os grupos avaliados e de modo semelhante (Liu et al., 2008; Gantwerker; Hom, 2012; Novaes et al., 2013).

A utilização de curativos oclusivos em associação com a terapia com laser de baixa intensidade não é frequentemente avaliada em trabalhos que estudam o efeito da fotobiomodulação (Peplow et al., 2010), mas estudo recente de Dantas et al. (2011) demonstrou que a combinação de fototerapia com laser e curativos de feridas pode acelerar os eventos biológicos (reepitelização, formação de vasos sanguíneos e deposição de fibras colágenas) envolvidos no processo de cicatrização de lesões de queimaduras.

Além de evitar a contaminação, os curativos oclusivos têm sido utilizados para aumentar a taxa de cura, para manter a ferida úmida e protegida, para induzir o tecido de granulação e para acelerar reepitelização (Guirro et al., 2010(a)). No entanto, a transmissividade do material que faz parte do curativo oclusivo pode interferir com a potência do laser aplicado e, consequentemente, com a resposta terapêutica (Chen et al., 2001; Guirro et al., 2010(a)), fazendo com que seja necessária sua remoção frequente para a aplicação de terapias, o que causa dor e lesões no tecido. Assim, o curativo ideal é aquele que permite a aplicação de terapias sem a sua remoção.

Guirro et al. (2010) realizaram um trabalho cujo objetivo foi identificar a transmissibilidade de vários materiais curativos de feridas utilizados na prática clínica quando utilizada a laserterapia com três comprimentos de onda. Concluíram que a membrana de biocelulose BioFill[®] (atualmente NEXFILL[®]) apresentou os melhores resultados na transmissibilidade da luz, o que ratifica o uso deste curativo no tratamento de feridas sem prejuízo para a aplicação da terapia com laser.

Neste trabalho, os resultados semelhantes entre os grupos I (laser) e III (laser em associação com a membrana de biocelulose NEXFILL[®]), observada através de análise imunohistoquímica, corroboram com os resultados do trabalho supracitado, pois demonstram que a aplicação do curativo não interferiu na ação do laser sobre os tecidos.

A avaliação da marcação da laminina, feita de acordo com Henriques et al. (2011), demonstrou que os animais que receberam a terapia com laser isoladamente (grupo I) foram os que apresentaram os piores resultados da análise em relação ao padrão de continuidade, quando este grupo foi comparado ao controle, II e III e esta diferença foi estatisticamente significante (p<0.05). A análise morfológica realizada na etapa anterior deste projeto já havia demonstrado uma inflamação persistente no grupo tratado com laser, com edema persistente e graduado como intenso na derme papilar (Noia, 2009).

Sabe-se que o processo inflamatório interfere diretamente na dinâmica da MEC e o prolongamento da fase de inflamação é o principal fator que leva ao atraso da cicatrização ou formação de cicatriz imprópria (Gantwerker; Hom, 2012). É possível que esse padrão de descontinuidade verificado no grupo tratado com laser seja atribuído à presença desse infiltrado inflamatório na área analisada, acarretando a liberação de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação de componentes teciduais no local (Quinderé et al., 2008; Gurgel et al., 2010).

Os grupos onde foi aplicada a membrana de celulose isoladamente ou em associação com o laser apresentaram resultados significantemente melhores que o grupo laser (p<0.05) em relação à continuidade da marcação de laminina na membrana basal subepitelial. A avaliação desses resultados isoladamente sugere que a aplicação da biomembrana de celulose favoreceu a deposição dessa proteína. Esse resultado pode estar relacionado à sua configuração nanoestrutural, que impede contaminação da área da ferida, restringe a perda de fluidos e apresenta uma configuração única que mimetiza as propriedades da MEC, ligando-se à agua e se comportando como um hidrogel que se integra ao tecido e permite a migração celular através de sua estrutura (Pecoraro et al., 2008; Petersen; Gateholm, 2011). Entretanto, mais estudos utilizando a biomembrana de celulose no reparo de queimaduras se fazem necessários a fim de confirmar seus efeitos benéficos em relação à velocidade de reepitelização. No que tange à marcação da laminina na membrana basal vascular, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes.

A dinâmica tridimensional de formação da MEC, bem como a ligação entre seus componentes macromoleculares e celulares, tem sido apontada como o ponto chave do processo de reparo de lesões em qualquer tecido, inclusive em queimaduras. A formação de uma matriz imatura de colágenos I e III é dependente da rede de fibronectina proporcionada pelas integrinas. O relacionamento entre fibronectina, fibroblastos e miofibroblastos é fundamental para o balanço entre formação de cicatriz e contração da ferida (Widgerow, 2012).

Dada a importância do papel da fibronectina no processo de reparo, terapias que possam desencadear aumento na sua deposição podem constituir importantes aliados desse processo, principalmente quando se tratar de feridas que apresentem alguma dificuldade ou retardo na cicatrização. Entretanto, o presente trabalho não conseguiu verificar um efeito bioestimulante do laser na deposição da fibronectina na área da ferida. Os grupos I, II e III apresentaram a marcação da fibronectina predominantemente descontínua nas proximidades da membrana basal, quando comparados ao grupo controle, porém sem significância estatística.

Quanto ao percentual de preenchimento e padrão da fibronectina na MEC, os grupos controle, I e III se comportaram de maneira similar. Em contrapartida, o grupo II apresentou os piores resultados, com um menor percentual de preenchimento e um padrão predominante reticular, que significa uma menor densidade da fibra. Este aspecto precisa ser mais bem

estudado, a fim de avaliar se a biomembrana de celulose pode interferir na biossíntese dessa glicoproteína.

Durante a análise imuno-histoquímica, foi observada a expressão de fibronectina no tecido epitelial em diversas regiões (Figura 6). Alguns trabalhos na literatura já apontaram os ceratinócitos como células que também secretam e depositam fibronectina na matriz pericelular (Kubo et al., 1984; Linnala et al., 1993; Kubo et al., 1994), sugerindo o papel dessa importante glicoproteína também na adesão intercelular do tecido epitelial.

Muitos parâmetros na aplicação do laser têm sido explorados, assim como muitas possibilidades quanto ao seu efeito biomodulador, e há disponível na literatura uma série de estudos que afirmam seus efeitos potencialmente benéficos no que tange à aceleração do processo de reparo tecidual. Mas, a despeito disso, a grande variabilidade nas metodologias e modos de avaliação dos resultados, apesar de constituírem parte do esforço científico para compreender melhor o mecanismo de ação dessa fonte de luz sobre os tecidos, tornam a comparabilidade e reprodutibilidade das pesquisas, por vezes, difícil. Assim, os resultados aqui obtidos não contradizem os efeitos benéficos da laserterapia, mas dão luz à necessidade da condução de novas pesquisas na tentativa de estabelecer os melhores parâmetros para sua utilização.

Quanto à biomembrana de celulose NEXFILL[®], esta já é amplamente reconhecida por seu papel e aplicabilidade como curativo de feridas na área médica (Pitanguy; Salgado; Maracajá, 1988; Peixoto; Santos, 1988). Embora nossa pesquisa tenha verificado que não houve superioridade do grupo tratado com a biomembrana em relação ao tempo de reepitelização, na comparação com o grupo controle, as suas características intrínsecas a mantém como curativo de feridas ideal. Por promover alívio da dor de forma quase imediata quando aplicada sobre lesões abertas, diminuir penetração de bactérias no ambiente da ferida, além de outras características previamente citadas nesse trabalho, a biomembrana pode diminuir o tempo de internação hospitalar e melhorar a qualidade de vida dos afetados por queimaduras durante sua recuperação (Pecoraro et al., 2008).

Finalmente, se faz necessária a realização de mais pesquisas de modo a conseguir determinar qual o protocolo mais indicado para obter os melhores resultados com a associação dessas duas terapias, bem como estabelecer consensos internacionais de avaliação do efeito do laser em vários modelos de doenças humanas.

7 CONCLUSÃO

- Em relação à ação do laser isoladamente (grupo I) na dinâmica de deposição dos colágenos III e I, bem como no padrão das fibras colágenas (fibrilar e/ou reticular) e aceleração do reparo das lesões de queimaduras induzidas no dorso dos ratos, não foi observada uma ação benéfica dessa terapia.

- Houve uma tendência de maior deposição de colágeno tipo III nas feridas tratadas com membrana de biocelulose isoladamente (grupo II) ou associada à laserterapia (grupo III), já no tempo de 7 dias, quando esses grupos foram comparados com o grupo laser (grupo I).

- A continuidade da marcação de laminina na membrana basal subepitelial nos grupos II e III, sugere que a membrana de celulose isoladamente ou em associação com o laser favoreceu a reepitelização de queimaduras de segundo grau.

- A aplicação da membrana de biocelulose isoladamente reduziu a preenchimento da ferida por fibronectina.

REFERÊNCIAS

AlGhamdi K M, Kumar A, Moussa N A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. Lasers Med Sci. 2012; 27:237–249. DOI 10.1007/s10103-011-0885-2.

Al-Watban FAH, Delgado M D. Burn healing with a diode laser: 670 nm at different doses as compared to a placebo group. Photomed Laser Surg. 2005; 23 (3): 245-250.

Al-Watban FAH, Zhang XY, Andres B. Low-level laser therapy enhances wound healing on diabetic rats: A comparison of differente lasers. Photom Laser Surg 2007; 25 (2): 72-77.

Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zettergvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. Br J Oral Maxillofac Surg. 1988 Feb; 26 (1): 12-17.

Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. Burns 2001; 27: 534-544.

Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, Taheri S, Rakhshan M. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: a histological and microbiological study. J Photochem Photobiol B: Biology 2005; 78: 171–177.

Bensadoun R, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on the literature review and meta-analysis. Oncology 2012; 24(0): 1-8.

Chen C, Diven DC, Lockhart S, Bell B. Laser transmission through transparent membranes used in cutaneous laser treatment. J Am Acad Dermatol. 2001 Dec; 45(6): 919-23.

Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. Dent Clin N Am. 2004; 48: 751–770.

Crisan B, Soritau O, Baciut M, Campian R, Crisan L, Baciut G. Influence of three laser wavelenghts on human fibroblasts cell culture. Lasers Med Sci. 2012.

Czaja W, Krystynowics A, Bielecki S, Brown Jr RM. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds. Biomaterials 2006; 27: 145-151

Dantas, MDM. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosanbased films and low level laser therapy. J Photochem Photobiol B: Biology. 2011; 105: 51– 59.

Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level Light Stimulates Excisional Wound Healing in Mice. Lasers Surg Med 2007; 39 (9): 706-715.

diabetic rats: a comparison of different lasers. Photomed Laser Surg 2007; 25(2): 72-77. Durbeej M. Laminins. Cell Tissue Res 2010; 339:259–268. DOI 10.1007/s00441-009-0838-2

Ferreira MC, Paggiaro AO, Isaac C, Teixeira Neto N, dos Santos GB. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. Rev Bras Cir Plást 2011; 26(4): 696-702.

Fiório F B, Albertini R, Leal-Junior E C P, Carvalho P T C. 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. DOI 10.1007/s10103-013-1341-2.

Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. Clin Plastic Surg 2012; 39: 85-97

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. J Bio Science 2009; 16:4. Doi:10.1186/1423-0127-16-4.

Guirro ECO, Montebelo MIL, Bortot BA, Torres MACB, Polacow MLO. Effect of laser (670 nm) on healing of wounds covered with occlusive dressing: a histologic and biomechanical analysis. Photomed and Laser Surg 2010; 28 (5): 629-634(b).

Guirro RRJ, Guirro ECO, Martins CC, Nunes FR. Analysis of low-level laser radiation transmission in occlusive dressings. Photomed and Laser Surg. 2010; 28 (4): 459-463(a).

Gurgel CAS. Immunolocalisation of laminin-1 in keratocystic odontogenic tumors. Acta histochemical 2010; 112: 624—629.

Halim AS, Khoo TL, Yussof SJM. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. Indian J Plast Surg Supplement 2010; 43: 23-28.

Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zettergvist L, Ridén H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. Swed Dent J. 1994; 18(1-2): 29-34.

Hamill KJ, Paller AS, Jones JCR. Dermatol Clin. 2010 January ; 28(1): 79. doi:10.1016/j.det.2009.10.009.

Henriques ACG, Vasconcellos MG, Galvão HC, De Souza LB, Freitas RA. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112:468-475

J. Labat-Robert. Cell–Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. Pathologie Biologie. 2012; 60: 15–19.

Jean E. Schwarzbauer1 Douglas W. DeSimone. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. Cold Spring Harb Perspect Biol; 3 (7). doi:10.1101/cshperspect.a005041.

Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. British J Plast Surg 2002; 55: 185-193.

Karu TI, Kolyakov MS. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. Photomed and Laser Surg 2005; 23(4): 355-361.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

Latarjet J. A simple guide to burn treatment. Burns 1995; 21(3): 221-225.

Lenselink SA. Role of fibronectin in normal wound healing. Int Wound J 2013; doi: 10.1111/iwj.12109

Lins RDAU, Lucena KCR, Granville-Garcia AN, Dantas EM, Silva JSP. Aplicação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. Odontol Clin Cient 2011; 511-516.

Lins RDAU, Lucena KCR, Graville-Garcia AN, Dantas EM, Catão MHCV, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. An Bras Dermatol 2010; 85(6): 849-855.

Liu H, Dang Y, Wang Z, Chai X, Ren Q. Laser induced collagen remodeling: a comparative study in vivo on mouse model. Lasers Surg Med 2008; 40:13–19.

Marchionni AM, Medrado AP, Silva TM, Fracassi LD, Pinheiro ALB, Reis SRA. Influence of laser (670nm) and dexamethasone on the cronology of cutaneos repair. Photomed Laser Surg. 2010; 28(5): 639-646.

Martu S, Amalinei C, Tatarciuc M, Rotaru M, Potarnichie O, Liliac L et al. Healing process and laser therapy in the superficial periodontum: a histological study. Rom J Morphol Embryol 2012; 53(1): 111-116.

Medrado A R A P, Pugliese L S, BS, Reis S R A, Andrade Z A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. Lasers Surg Med 2003; 32: 239–244.

Meireles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. Photomed Laser Surg 2008; 26(1): 47-54.

Merli LAS, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. Photomed Laser Surg. 2005; 23 (2): 212-215.

Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. Int J Biochem Cell Biol 36 (2004) 1031–1037.

Miner JH. Laminins and their roles in mammals. Microsc Res Tech 2008; 71:349–356.

Moraes J M et al. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of thirddegree burn wounds in rats. Lasers Med Sci. 2013; 28:1169–1176. DOI 10.1007/s10103-012-1213-1.

Noia MP. Análise morfológica do reparo de queimaduras de Segundo grau submetidas ao tratamento com membranade cellulose microbiana associada ao laser AlGaInP a 660nm em ratos albinos Wistar. Dissertação (Mestrado). Salvador: UFBA, 2009.

Novaes RD et al. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention Int J Exp Path 2013 doi: 10.1111/iep.12063 1-8.

Nunez SC, França CM, Silva DFT, Nogueira GEC, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. Lasers Med Sci 2012 may;

Nunez SC, Nogueira GEC, Ribeiro MS, Garcez AS, Lage-Marques JL. He-Ne effects on blood microcirculation during wound healing: a method of in vivo study through laser doppler flowmetry. Lasers Surg Med 2004; 35: 363-368.

Nussbaum EL, Mazzulli T, Pritzker KP, Heras FL, Jing F, Lilge L. Effects of low intensity laser irradiation during healing of skin lesions in the rat. Lasers Surg Med. 2009;41(5):372-81.

Peck, MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. Burns 2011; 37: 1087-1100.

Pecoraro et al. Bacterial Cellulose from Glucanacetobacter xylinus: Preparation, Properties and Applications. In: Monomers, polymers and composites from renewable resources. Oxford. Ed Elsevier. 2008.

Peixoto R, Santos DL. Biofill: uso e avaliação clínica de uma película de celulose em lesões cutâneas. Rev Bras Cir 1988: 78 (2): 141-145.

Peplow PV, Chung T, Baxter GD. Laser Photobiomodulation of Wound Healing: A Review of Experimental Studies in Mouse and Rat Animal Models. Photomed Laser Surg 2010; 28 (3): 291-325.

Pinheiro ALB, Brugnera Junior A, Zanin FAA. Aplicação do laser na odontologia. São Paulo. Ed Santos. 2010. 436p.

Pinheiro ALB, Vieira ALB, Almeida DS, Meireles GCS, Nunes J, Carvalho CM. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished Wistar rats. Braz Dent J 2004; 15:21-28.

Pitanguy I, Salgado F, Maracajá PF. Utilização de película de cellulose (Biofill[®]) como curative biológico. Rev Bras Cir 1988: 78 (5): 317-326.

Poli VD. Análise da fluência do laser fosfeto de índio-gálio-alumínio no processo de reparo de feridas em dorso de ratos. Tese (Doutorado). Porto Alegre: PUCRS, 2010. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. Experimental Biology and Medicine. 2012; 237: 1241-1248.

Pugliese L S, Medrado A L, Reis S R A, Andrade Z A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras 2003;17(4):307-313

Quinderé LB, Nonaka CFW, Souza LB, Pinto LP. Expressão imuno-histoquímica de colágeno IV, tenascina-C e fibronectina em lesões centrais e periféricas de células gigantes. Rev Inst Ciênc Saúde. 2008; 26 (2): 226-31.

Quinn KJ, Courtney JM, Evans JH, Gaylor JDS. Principles of burn dressings. Biomaterials 1985; 6: 369-377.

Rahmanian-Schwarz A, Beiderwieden A, Willkomm L, Amr A, Schaller H, Lotter O. A clinical evaluation of Biobrane® and Suprathel® in acute burns and reconstructive surgery. Burns 2011; 37: 1343-1348.

Ribeiro MA, Albuquerque RL, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. Photomed Laser Surg. 2009;27(1):49-55.

Rocha Junior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. An Bras Dermatol 2006; 81(2): 150-156.

Rosic R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S. Nanofibers and their biomedical use. Acta Pharm. 2013; 63: 295–304.

Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. Developmental Biology. 2010; 341: 126–140.

Saffle JR. Closure of the Excised Burn Wound: Temporary Skin Substitutes. Clin Plastic Surg 2009; 36: 627-641.

Schlager A, Kronberger P, Petschke F, Ulmer H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparision between two different wavelength (635 nm and 690 nm) and a placebo group. Lasers Surg Med 2000; 27 (1): 39-42.

Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound Rep Reg 2009; 17: 153–162. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in Vitro. Photom Laser Surg 2005; 23(2): 161-166.

Tuner J, Hode L. It's all in the parameters: a clinical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. J Clin Laser Med Surg 1998;16: 245-8. Vandamme EJ, Baets S, Vanbaelen A, Joris K, Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. Polymer Degradation and Stability 1998; 59: 93-99.

Watts A M I, Tyler M P H, Perry M E, McGrouther A H N. Burn depth and its histological measurement. Burns. 2001; 27: 154–160.

WHO.

2013.

http://www.who.int/violence_injury_prevention/other_injury/burns/en/index.html

Widgerow, AD. Cellular resolution of inflammation – catabasis. Wound Rep Reg 2012; 20: 2-7

Widgerow, AD. Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. Wound Rep Reg 2011; 19: 17-133

Wong-Riley MTT et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inativacted by toxins. J Biol Chem. 2005, 280:6; 4761-4771.

ANEXO A - Protocolo do modelo experimental

Os 64 ratos albinos da espécie *Rattus norvegiccus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, jovens, sadios, idade aproximada de dois meses e com 150-200gr de peso, foram provenientes do Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Até a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais permaneceram em gaiolas individuais forradas com maravalha, que foi renovada ciclicamente. A alimentação foi livre e padronizada (Labina[®]) e a água *ad libitum*. A temperatura média foi de 22°C com ciclo claro/escuro de 12h em condições normais de umidade.

Foram realizados cinco ensaios pilotos a fim de que fosse alcançada a temperatura ideal do instrumento indutor da ferida de 4 cm², bem como do tempo de aplicação desse instrumento aquecido sobre o tecido cutâneo, de modo a se obter uma queimadura de segundo grau padronizada. A obtenção da queimadura de segundo grau foi confirmada com exame histopatológico após cada ensaio piloto. Uma vez determinados os parâmetros de tempo/temperatura, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução 1:1 de cloridrato de quetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Após a fase anestésica, seguiu-se a tricotomia manual, antissepsia com Iodo Polivinilpirrolidona e, então, aplicação do instrumento aquecido sobre o tecido, a uma temperatura de 100°C, aferida por um termômetro de mercúrio, com duração de 0,5 segundos, medido com o auxílio de um cronômetro digital.

Após a indução da queimadura, os animais receberam uma dose de dipirona sódica líquida por via oral, ajustada de acordo com o peso dos mesmos. Os animais foram, então, divididos em grupos de acordo com o tipo de tratamento proposto para cada grupo: Grupo Controle, submetidos apenas à queimadura de segundo grau; GI, submetido à queimadura de segundo grau e tratados com laser; GII, submetido à queimadura de segundo grau e tratados com laser; GII, submetido à queimadura de segundo grau e tratados com laser associado à membrana de celulose bacteriana Nexfill[®]; GIII, submetidos à queimadura de segundo grau e tratados com laser associado à membrana de celulose bacteriana Nexfill[®].

Os animais alocados nos grupos GI e GIII foram irradiados com laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (AlGaInP) com os seguintes parâmetros: λ 660nm com dose de 20J/cm², 40mW, Ø = 4mm, t=125s. A aplicação do laser se deu imediatamente após a indução da queimadura, seguida de uma irradiação a cada 48h até um dia antes da morte dos animais.

Para a aplicação da biomembrana no grupo GII, foi feito debridamento da ferida para remoção da epiderme comprometida e exposição do tecido subcutâneo trófico. Após o preparo do leito da ferida, a biomembrana foi aplicada sob a forma de fragmentos de 2,5 x 2,5 cm.

A morte dos animais para cada grupo com 16 animais se deu às 24h (n=4), 3 dias (n=4), 7 dias (n=4) e 14 dias (n=4) e foi realizada individualmente por asfixia em câmara de CO_2 . Após a constatação da ausência de sinais vitais, as amostras de tecido foram removidas com auxílio de lâmina de bisturi com profundidade de aproximadamente 3 mm e margem de segurança de 5 mm além dos limites da lesão. Após a remoção, os espécimes foram preparados para processamento histológico.

ANEXO B - Análise Morfológica

Os casos onde a morte dos animais ocorreu às 24 horas do experimento apresentaram, na derme reticular, infiltrado inflamatório polimorfonuclear graduado como intenso, como se segue: grupo controle= 100%, I= 75% e II= 75%. O Grupo III não seguiu o padrão dos demais e apresentou 75% (n=3) dos casos com infiltrado inflamatório graduado como moderado. Na derme papilar, neste mesmo tempo experimental, houve predominância de células inflamatórias características de um processo agudo. O infiltrado inflamatório de grau moderado foi apresentado por todos os casos dos grupos controle e I, 50% (n=2) do II e 75% (n=3) do III. Houve discreto edema em 50% (n=2) dos casos dos grupos Controle e II e edema moderado em todos os casos do grupo I (n=4). O grupo III não apresentou edema em 50% (n=2) dos exemplares. Com relação às alterações das bordas epiteliais, ainda às 24 horas do experimento, os grupos I e II apresentaram 75% dos casos com edema intracelular (degeneração hidrópica) discreto. Espongiose foi verificada apenas nos grupos II (25%, n=1) e III (75%, n=3). Exocitose discreta foi observada em todos os animais do grupo Controle e em 25% (n=1) do grupo II. A exocitose foi intensa em 75% (n=3) dos animais do grupo III e ausente no grupo I. Todos os animais de todos os grupos apresentaram a ferida coberta pela crosta fibrinoneutrofílica neste tempo experimental.

Aos três dias do experimento, na derme papilar, células inflamatórias do processo agudo estavam presentes em 75% (n=3) dos grupos Controle, II e III. O grupo I apresentou infiltrado misto. A graduação foi discreta em todos os grupos. Quanto à presença de edema, os grupos I e II apresentaram em todos os casos. Porém o edema estava ausente em 100% (n=4) do controle e 75% (n=3) do grupo III. Na derme reticular, aos três dias do experimento, metade dos animais dos grupos Controle, I e II (n=2) apresentou infiltrado inflamatório agudo. Porem em 75% (n=3) do grupo III, este infiltrado estava ausente. A quantidade de células inflamatórias foi discreta em todos os animais do grupo I, 50% (n=2) do Controle e grupo II e ausente em 75% (n=3) do grupo III. Acantose discreta foi percebida em 100% (n=4) dos grupos II e III e acantose moderada em 100% (n=4) do Controle e 50% (n=2) do grupo I. Degeneração hidrópica foi moderada em 50% (n=2) dos casos do grupo I e grupo III e 75% (n=3) do Controle. Essa mesma alteração inflamatória foi predominantemente discreta no grupo II. A espongiose foi discreta no grupo Controle, ausente em todos os animais (n=4) dos grupos I e II e em 75% (n=3) do III. Aos três dias ainda, apenas o grupo III apresentou todos os animais (n=4) com a ferida parcialmente coberta pela membrana fibrinoneutrofílica. Todos os espécimes já apresentavam pelo menos 50% de regeneração epitelial neste tempo experimental.

No sétimo dia experimental, na derme papilar, todos os animais do grupo I apresentaram infiltrado inflamatório de natureza mista, contra 50% (n=2) dos grupos Controle, II e III. Quanto ao edema, este foi intenso em 100% (n=4) do grupo I, discreto em 50% (n=2) do controle e II e ausente no III. Na derme reticular, o infiltrado inflamatório esteve ausente nos grupos Controle, II e III. Porém apresentou-se como crônico em todos os animais do grupo I, que também apresentou edema moderado em 75% (n=3) de seus animais. A acantose esteve ausente no grupo III e moderada em 50% (n=2) do Controle e em 75% (n=3) do I e II. Degeneração hidrópica, espongiose e exocitose foram pobremente percebidas neste tempo experimental. Quanto à presença da crosta fibrinoneutrofílica, 100% (n=4) dos casos do grupo I apresentavam a crosta em toda a extensão da superfície da ferida, contra 50% (n=2) do II, enquanto 100% do grupo III apresentavam cobertura apenas parcial. O grupo Controle apresentou n=2 com cobertura parcial e n=2 sem cobertura. Ainda em relação ao

sétimo dia experimental, todos os animais dos grupos controle, II e III apresentaram-se com regeneração epitelial completa, contra 75% (n=3) do grupo I.

No 14° dia do experimento, na derme papilar, o infiltrado inflamatório foi classificado como crônico ou misto. Quando discreto, houve a seguinte distribuição: Controle e II com 100% (n=4) cada e I com 75% (n=3). O edema estava ausente no II, mas foi discreto em 100% (n=4) do Controle e III e em 75% (n=3) do I. A acantose estava totalmente ausente no grupo Controle e na metade (n=2) do grupo III. Entretanto, os grupos I e II apresentaram-se com metade dos espécimes com acantose discreta e a outra metade com acantose moderada em ambos os grupos. Neste tempo experimental, apenas os animais do grupo III apresentaram crosta parcial em todos os animais, enquanto os animais dos outros grupos experimentais apresentaram ausência da crosta. Já no 14° dia do experimento, todos os espécimes haviam completado a reepitelização.