JAQUELINE DE SOUZA CRUSCA

**Laser de baixa intensidade no tratamento de úlceras
cutâneas aplicando curativos de pericárdio porcino
revestido com quitosana**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

São Carlos
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

C9571 Crusca, Jaqueline de Souza
Laser de baixa intensidade no tratamento de úlceras
cutâneas aplicando curativos de pericárdio porcino
revestido com quitosana / Jaqueline de Souza Crusca ;
orientador Nivaldo Antonio Parizotto. -- São Carlos,
2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola
de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2010.

1. Laserterapia. 2. Pericárdio porcino. 3. Quitosana.
3. Úlcera cutânea. 4. Cicatrização de feridas. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

JAQUELINE DE SOUZA CRUSCA
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 17/12/10.

PROF. DR. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO
(ORIENTADOR)

Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Resultado: APROVADA

Assinatura:

PROF. DR. RICHARD ELOIN LIEBANO

Universidade Cidade de São Paulo - UNICID

Resultado: APROVADA

Assinatura:

PROF. DR. SERGIO AKINOBU YOSHIOKA

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura:

A Deus

Pela minha vida, por todas as graças concedidas e por sempre guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Márcia (in memorian) e Edson

A vocês que sempre renunciaram os seus desejos próprios em favor dos meus e dos meus irmãos. Vocês fizeram de meus sonhos os seus, sem medir esforços para realizá-los. Pai, obrigada pela motivação e confiança.

Ao Thi

Pelo amor incondicional, companheirismo, paciência, compreensão, e muito carinho nas horas mais difíceis.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Às minhas irmãs Ju e Jane, cunhados Nino e Rê, e sobrinhos Tathi, Thalita, Pedro e Maria, pela compreensão da ausência e também pela coragem e perseverança que me passaram durante toda essa trajetória, possibilitando alcançar mais este objetivo.

Ao meu irmão Júnior e cunhada Juks, pela motivação inicial, me mostrando os caminhos para chegar a esta conquista.

Aos meus grandes amigos, dona Regina e seu Luis, por tanto carinho e atenção.

Aos meus futuros sogros, Pi e Priosque, meu futuro cunhado Rafa e a avó Teresinha, pelo apoio e cuidados.

Às minhas amigas de moradia Nina, Lena, Tassi e Mari, pelo enorme carinho.

Ao meu amigo Nelson Ferreira da Silva Júnior, por além de me ajudar nos procedimentos cirúrgicos, sempre esteve ao meu lado para todas as horas.

Ao Prof.Dr. Orivaldo Lopes da Silva, pela amizade e conselhos.

À Prof^a. Ana Maria Plepis, à química Virginia da Conceição Amaro Martins e aluna Fabiana Tessari Rodrigues, do Grupo de Bioquímica e Biomateriais IQSC/USP, pelo fornecimento do biomaterial utilizado nesta pesquisa e amizade.

Às minhas amigas do Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar, Livia, Davilene e principalmente à Vivian Cury, pelo carinho, oportunidade e contribuição para o meu crescimento profissional.

A todos os meus amigos da Bioengenharia, entre eles, Gaby, Vitor, Fabíola, Ana Elisa, Ale, Uziel, Emiliano, Leo...

Ao Dr. Manuel Marcos, da Empresa Acecil Central de Esterilização com Ind. Ltda., pela parceria no processo de preparação do biomaterial.

Ao técnico do Laboratório de Transformações de Fases da EESC/USP, Pedro Luiz Di Lorenz pela ajuda nos registros histológicos.

Ao Prof. Dr. José Carlos A. Cintra e aos amigos da disciplina “Didática e Oratória em Ensino Superior”, pela amizade e motivação.

Às Secretárias Janete e Eunice, pela paciência e ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da USP, pela oportunidade nesta importante etapa de minha vida acadêmica.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que o projeto se tornasse possível.

Muito Obrigada!!!

“Pode um homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pela suas próprias experiências”.

Mansour Chalita

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim...”

Chico Xavier

RESUMO

CRUSCA, J. S. (2010). Laser de baixa intensidade no tratamento de úlceras cutâneas aplicando curativos de pericárdio porcino revestido com quitosana. 107f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

As lesões na pele, quando extensas, representam um grande problema de saúde pública e elevados custos associados aos tratamentos. A laserterapia tem sido aplicada por décadas a fim de acelerar o processo de cicatrização cutânea. Já a matriz de pericárdio porcino apresenta potencial para ser utilizado como curativo biológico, porém o *patch* tem rápida biodegradação, por isso adicionou-se quitosana. Muitos autores observaram esses tratamentos individualmente, no entanto não há dados concisos sobre a associação dessas terapias. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta clínica, histológica e histomorfométrica da ação fotobiomoduladora do laser no processo de reparação de úlceras cutâneas com o auxílio do curativo de pericárdio porcino revestido com quitosana. A úlcera cutânea foi induzida cirurgicamente em 48 ratos distribuídos em 6 grupos distintos com 8 animais cada, sendo eles: Matriz (curativo de pericárdio porcino); ML (curativo de pericárdio porcino com a aplicação da laserterapia); MQ (curativo de pericárdio porcino revestido com quitosana); MQL (curativo de pericárdio porcino revestido com quitosana com a aplicação da laserterapia); Ctrl (o grupo controle que não recebeu curativo algum) e Laser (o grupo controle que recebeu somente a laserterapia). Nos grupos que receberam imediatamente após o procedimento cirúrgico a radiação laser, com as seguintes características: comprimentos de onda da luz = 660nm, irradiância = 30mW/cm², e densidade de energia de 30J/cm². O registro fotográfico das úlceras foi realizado no 10º dia pós-operatório e para fornecer a área ulcerada foi utilizado o software *Image J*. Foi realizada uma análise histológica e histomorfométrica (contagem de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e colágenos) a partir de biópsias coletadas no 10º dia pós-operatório. Os resultados obtidos foram dados através das médias dos grupos com relação a cada análise, sendo eles: área da lesão (Laser=0,48cm², Matriz=0,46cm², Ctrl=0,28cm², ML=0,23cm², MQ=0,22cm² e MQL=0,19cm²); formação colagênica (Laser=54,51%, Matriz=51,75%, Ctrl=58,84%, ML=68,77%, MQ=69,50% e MQL=71,72%); células inflamatórias (Laser=126,31, Matriz=132,40, Ctrl=101,85, ML=97,67, MQ=95,27 e MQL=94,15); vasos sanguíneos (Laser=6,83, Matriz=4,48, Ctrl=5,37, ML=7,46, MQ=5,42 e MQL=3,98) e fibroblastos (Laser=55,83, Matriz=71,31, Ctrl=78,63, ML=85,40, MQ=105,06 e MQL=108,58). Os dados foram analisados pela análise de variância, com post hoc de Tukey, a fim de comparar os grupos com um nível de significância de 95% (p<0,05). Com base nesses achados, observou-se que houve melhora estatisticamente significativa no grupo com curativos de pericárdio porcino revestido com quitosana associado à aplicação da laserterapia (MQL) quando comparado ao controle, mostrando-se mais eficaz no processo cicatricial de úlceras.

Palavras-chave: Laserterapia, Pericárdio porcino, Quitosana, Úlcera cutânea, Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Crusca, J. S. (2010). **Low level laser therapy for treatment of skin ulcers by applying dressings porcine pericardium coated with chitosan.** 107f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Large skin injuries represent a major public health issue, with high costs associated with the treatments. Laser therapy has been used for decades to accelerate the process of skin healing. The porcine pericardium matrix has the potential to be used as a biological dressing, but the patch has rapid biodegradation, so chitosan was added to delay this effect. Many authors have used these treatments individually; however there is no accurate data on the combination of these therapies. The aim of this study was to assess the clinical, histological and histomorphometric photobiomodulation laser action in the repair of skin ulcers associated with porcine pericardium dressing coated with chitosan. The skin ulcer was surgically induced in 48 rats, which were distributed into 6 groups with 8 animals each: Matrix (porcine pericardium dressing), ML (porcine pericardium dressing with laser therapy), MQ (porcine pericardium dressing coated with chitosan), MQL (porcine pericardium with a bandage coated with chitosan and laser therapy), Ctrl (the control group did not receive treatment) and Laser (the control group that received only laser therapy). The laser radiation groups received the treatment immediately after the surgery, with the following characteristics: light wavelength = 660nm, irradiance = 30mW/cm² and of energy density 30J/cm². The photographic record of the ulcers was performed on the 10th postoperative day and to provide the ulcerated area was used the software *ImageJ*. We performed a histological and histomorphometric (count of fibroblasts, inflammatory cells, blood vessels and collagen) from biopsies also on the 10th postoperatively day. The results were given as means of groups from each analysis, as follows: lesion area (Laser=0,48cm², Matriz=0,46cm², Ctrl=0,28cm², ML=0,23cm², MQ=0,22cm² e MQL=0,19cm²), collagen formation (Laser=54,51%, Matriz=51,75%, Ctrl=58,84%, ML=68,77%, MQ=69,50% e MQL=71,72%), inflammatory cells (Laser=126,31, Matriz=132,40, Ctrl=101,85, ML=97,67, MQ=95,27 e MQL=94,15); blood vessels (Laser=6,83, Matriz=4,48, Ctrl=5,37, ML=7,46, MQ=5,42 e MQL=3,98) and fibroblasts (Laser=55,83, Matriz=71,31, Ctrl=78,63, ML=85,40, MQ=105,06 e MQL=108,58). Data were analyzed by analysis of variance with Tukey's post hoc to compare the groups with a significance level of 95% (p <0.05). Based on these findings, we observed that there was a statistically significant improvement in the group with porcine pericardium dressings coated with chitosan associated with the application of laser therapy (MQL) compared to control, displaying more effective in healing ulcers.

Keywords: Laser therapy, porcine pericardium, Chitosan, Skin ulcer, Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Figura de pele em corte tridimensional	25
Figura 2 -	Reparo tecidual por regeneração e por fibrose	28
Figura 3 -	Fases da cicatrização de feridas	29
Figura 4 -	Importantes funções dos magrófagos nas fases do processo de cicatrização	31
Figura 5 -	Formas de cicatrização	33
Figura 6 -	Esquematisação da lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa o repouso, (b) a bioestimulação e (c) a bioinibição	40
Figura 7 -	Interação da luz laser com os tecidos	41
Figura 8 -	Registro fotográfico da matriz acelular de pericárdio porcino	49
Figura 9 -	Caracterização por MEV da matriz de pericárdio porcino (A) e da matriz de pericárdio porcino revestida com quitosana (B)	49
Figura 10 -	Laser Terapêutico	50
Figura 11 -	A) Campo cirúrgico fenestrado; B) Ferida cirúrgica	52
Figura 12 -	A) Hidratação da matriz, B) sutura; C) seu aspecto imediatamente após a fixação	53
Figura 13 -	Aplicação da irradiação <i>laser</i> com posicionamento da barreira plástica entre caneta do <i>laser</i> e a úlcera	53
Figura 14 -	Segmentação da área ulcerada	55
Figura 15 -	Exemplo do protocolo para histomorfometria das lâminas coradas com HE (500x) utilizando o Plugin “Cell Counter” do ImageJ.....	56
Figura 16 -	Exemplo do procedimento para análise da quantidade de colágeno, através de lâminas coradas com Tricrômico de Masson utilizando o Plugin “Colour Deconvolution” do ImageJ.....	57
Figura 17 -	Foto representativa dos grupos com <i>patches</i> onde a seta mostra a formação da matriz em crosta	60
Figura 18 -	Foto representativa dos grupos sem matriz onde a seta mostra a formação da crosta na úlcera	61

Figura 19 -	No 10º dia pós-operatório imagens representativas dos grupos experimentais	62
Figura 20 -	No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (TM) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da formação do colágeno, onde as setas indicam a área azul, podendo ser mais densa, organizada e paralela [500x].....	63
Figura 21 -	No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da distribuição das células inflamatórias, onde as setas indicam algumas dessas células [500x]	64
Figura 22 -	No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações do calibre dos vasos sanguíneos, onde as setas indicam alguns desses vasos [500x]	65
Figura 23 -	No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da forma dos fibroblastos, onde as setas indicam alguns dessas células [500x]	66
Figura 24 -	As médias das áreas das lesões dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle	67
Figura 25 -	As médias da quantidade de formação de colágeno dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle.....	68
Figura 26 -	As médias dos números de células Inflamatórias dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle	69
Figura 27 -	As médias do número de vasos sanguíneos dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle	70
Figura 28 -	As médias do número de fibroblastos dos grupos experimentais e seu desvio padrão – CTRL; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores das médias e desvios padrões da área da lesão dos respectivos grupos experimentais: Ctrl (controle), Laser (tratados com Laser), Matriz (tratados com matriz de pericárdio), ML (tratados com matriz de pericárdio e laser), MQ (tratados com matriz de pericárdio associada a quitosana) e MQL (tratados com matriz de pericárdio associada a quitosana e laser)	101
Tabela 2 –	Valores das médias e desvios padrões da área da lesão dos respectivos grupos experimentais: Ctrl, Laser, Matriz, ML, MQ e MQL	102
Tabela 3 –	Descritiva para as variáveis de Fibroblastos, Células Inflamatórias, Vasos Sanguíneos e Colágeno de acordo com os grupos	103
Tabela 4 –	Comparações dos grupos para variável Colágeno	104
Tabela 5 –	Comparações dos grupos para variável Fibroblasto	105
Tabela 6 –	Comparações dos grupos para variável Células Inflamatórias	106
Tabela 7 –	Comparações dos grupos para variável Vasos Sanguíneos	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaInP	Alumínio Gálio Índio Fósforo
AsGa	Arsenieto de Gálio
AsGaAl	Arsenieto de Gálio e Alumínio
ATP	Adenosina Trifosfato
β - quitina	Beta – quitina
Ctrl	Grupo Controle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DSC-P200	Digital Still Camera – Câmera Digital
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
He-Ne	Hélio e Neônio
HE	Hematoxilina e Eosina
IL - 1 β	Interleucina 1 Beta
InGaAlP	Índio Gálio Alumínio Fósforo
Laser	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LLLT	Terapia com Laser de Baixa Intensidade
MASER	Amplificador de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	Grupo matriz/laser
MQ	Grupo matriz/quitosana
MLQ	Grupo matriz/quitosana/laser
NIST	National Institute of Standards and Technology
P	Potência Óptica Útil
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PF-4	Fator Plaquetário 4
RNA	Ácido Ribonucléico
Td	Temperatura de desnaturação
TG	Termogravimetria
TGF β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TM	Tricrômico de Masson
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
%	Porcentagem
Nm	Nanômetro
W	Watts
mW	miliWatts
Λ	Comprimento de Onda
mW/cm²	miliWatts por centímetro quadrado
W/cm²	Watts por centímetro quadrado
J/cm²	Joule por centímetro quadrado
s	Segundo
cm²	centímetro quadrado
g	Grama
h	Hora
K⁺	íon potássio
Na⁺	íon sódio
Ca⁺⁺	íon cálcio
°C	Grau Celsius
HCl	Ácido Clorídrico
NaOH	Hidróxido de Sódio
J/ponto	Joule por ponto
mg/kg	Miligrama por quilograma
cm	Centímetro
μm	Micrômetro
KCl	Cloreto de Potássio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	23
2.2	Específico	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	Morfofisiologia da Pele	25
3.1.1	<i>Epiderme</i>	25
3.1.2	<i>Derme</i>	26
3.1.3	<i>Hipoderme</i>	27
3.2	Úlceras Agudas	27
3.3	Reparo Tecidual	28
3.3.1	<i>Cicatrização</i>	28
	<u><i>Fase de Coagulação</i></u>	29
	<u><i>Fase Inflamatória</i></u>	30
	<u><i>Fase Proliferativa</i></u>	31
	<u><i>Fase de Remodelamento</i></u>	32
3.4	Matriz Dérmica Acelular	34
3.5	Laser de Baixa Intensidade	37
3.5.1	<i>Histórico</i>	37
3.5.2	<i>Propriedades e Comportamento da Radiação Laser</i>	38
3.5.3	<i>Princípios do Equipamento Laser</i>	38
3.5.4	<i>Parâmetros da Irradiação</i>	39
3.5.5	<i>Penetração da Luz nos Tecidos</i>	41
3.5.6	<i>Mecanismo dos Efeitos da Fotobioestimulação</i>	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Animais de Experimentação	48
4.2	Materiais	48

4.2.1	<i>Matriz Dérmica Acelular</i>	48
4.2.2	<i>Equipamento Emissor da Radiação</i>	50
4.3	Métodos	51
4.3.1	<i>Delineamento Experimental</i>	51
4.3.2	<i>Técnica Cirúrgica</i>	52
4.3.3	<i>Avaliação Clínico Fotográfica</i>	54
4.3.4	<i>Estudo Histológico</i>	54
4.3.5	<i>Eutanásia dos Animais</i>	55
4.3.6	<i>Análise de Imagem</i>	55
	<u><i>Delimitação e Quantificação da Área Total da Úlcera</i></u>	55
	<u><i>Histomorfometria das Células e Vasos Sanguíneos</i></u>	55
	<u><i>Quantificação do Colágeno</i></u>	56
4.3.7	<i>Análise dos Resultados</i>	58
5	RESULTADOS	59
5.1	Análise Qualitativa	60
5.1.1	<i>Análise Clínico-Fotográfica</i>	60
5.1.2	<i>Análise Microscópica</i>	62
	<u><i>Formação de Colágeno</i></u>	62
	<u><i>Células inflamatórias</i></u>	63
	<u><i>Vasos Sanguíneos</i></u>	64
	<u><i>Fibroblastos</i></u>	65
5.2	Análise Quantitativa	66
5.2.1	<i>Análise Macroscópica</i>	67
5.2.2	<i>Análise Microscópica</i>	68
	<u><i>Formação de Colágeno</i></u>	68
	<u><i>Células Inflamatórias</i></u>	69
	<u><i>Vasos Sanguíneos</i></u>	69
	<u><i>Fibroblastos</i></u>	70
6	DISCUSSÃO	72
6.1	Metodologia	73

6.2	Dados Qualitativos	74
6.3	Dados Quantitativos	76
6.4	Perspectivas	80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
8	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão com estrutura e função complexa que quando sofre dano irreversível como queimadura de terceiro grau, trauma ou doença é de difícil reparação (SCHULZ III; TOMPKINS; BURKE, 2000). Quando a perda celular e tecidual é mais extensa, o processo de reparação é mais complicado, a regeneração de células parenquimatosas é incapaz de recompor integralmente a arquitetura original levando a um abundante crescimento de tecido de granulação a partir da margem para completar o reparo (COTRAN et al., 1996; SCHULZ III; TOMPKINS; BURKE, 2000).

Assim, o transplante autólogo de pele tem sido a forma mais comum de tratamento para pacientes com significativa perda de pele, no entanto existem diferentes produtos a serem usados para repor a pele seja temporária ou permanentemente (BOYCE et al., 1999).

A utilização e o desenvolvimento de biomateriais de origem biológica para a regeneração tecidual são de grande importância. Dentre esses biomateriais estão os curativos biológicos obtidos a partir de vários materiais, entre eles, tecidos acelulares que fornecem uma matriz tecidual regenerativa. O pericárdio porcino acelular é passível de modificações, por apresentar propriedades como baixa antigenicidade, atoxicidade e biocompatibilidade (HATTORI et al., 2006; LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Entretanto, a biodegradação desse material é muito rápida, por isso, a adição de quitosana pode diminuir a taxa de degradação (RODRIGUES et al., 2010). Além disso, a quitosana tem ação antimicrobiana e redutora do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000).

Outra alternativa de tratamento empregado na reparação tecidual atualmente é a aplicação do *laser* de baixa intensidade com o intuito de acelerar o processo cicatricial das lesões. Quando comparado a outros recursos utilizados rotineiramente, este, apresenta efeitos notáveis sobre a remodelação de tecidos cicatriciais, provavelmente derivando da redução do edema, da diminuição do processo inflamatório, do aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

A maioria dos efeitos registrados diz respeito à proliferação celular, principalmente de fibroblastos. Porém, a proliferação não é o único meio pelo qual a laserterapia pode acelerar o processo cicatricial. A radiação estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos e modifica estes em miofibroblastos, os quais estão envolvidos na contração de tecido de granulação; a produção de ATP; o acréscimo na atividade dos linfócitos atingindo efeito antibacteriano de modo anti-séptico e melhora a vascularização (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

Diversos estudos têm sido realizados para compreender o processo de cicatrização de feridas, objetivando esclarecer os diferentes aspectos do tecido de granulação, da epitelização

e da neoformação tecidual, bem como os possíveis efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no processo de reparo tecidual.

Com base na literatura verificamos que o *laser* e curativos biológicos são eficientes no tratamento da reparação cicatricial, reduzindo principalmente o período de reparação. Por esse motivo, surgiu o interesse em investigar a radiação do *laser* na lesão cutânea com a aplicação da matriz dérmica acelular de pericárdio porcino revestida com quitosana (curativo biológico ou *patch*), pois o curativo permitiu a passagem da laserterapia, sem removê-lo, diferente dos curativos sintéticos que precisam ser removidos para realização da laserterapia.

Mediante as análises macroscópicas, histopatológica e histomorfométrica, este trabalho avaliou o comportamento clínico-biológico de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com a aplicação do curativo biológico, que foram submetidos à terapia *laser* de baixa intensidade.

2 OBJETIVOS

2.1 – Geral

Este trabalho tem por objetivo analisar a ação fotobiomoduladora do laser, no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos, com o auxílio do curativo de pericárdio porcino (*patch*) e verificar se a matriz acelular é eficaz como substituto temporário de pele no tratamento de lesões extensas, permitindo a reepitelização e preparando o leito para a enxertia definitiva.

2.2 – Específicos

- ✓ Avaliar qual matriz é melhor no reparo tecidual.
- ✓ Avaliar qual tratamento proporciona menor tempo de cicatrização.
- ✓ Avaliar quanto o *patch* bloqueia a radiação laser.
- ✓ Avaliar as diferenças histológicas na pele entre os grupos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Morfofisiologia da Pele

A pele recobre toda a superfície do corpo, sendo o órgão mais extenso, correspondendo 16% da massa de seu corpo e é constituída por uma porção epitelial, a epiderme e uma porção conjuntiva, a derme (Figura 1). A hipoderme, que não faz parte da pele, está abaixo e em continuidade com a derme, servindo apenas de suporte e união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; McGRATH; EADY; POPE, 2004).

Figura 1 - Figura de pele em corte tridimensional
Fonte: Saúde Total (2009)

Desempenha várias funções como proteção contra toxinas e microorganismos presentes no ambiente, termoregulação por meio de seus vasos, barreira hídrica, participação no sistema imunológico, propriedade sensorial, glândulas e tecido adiposo, auto-regeneração, além da excreção de diversas substâncias (BARANOSKI; AYELLO, 2004; CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007).

3.1.1 – Epiderme

É a camada mais externa da pele, sendo constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (avascular). Ela apresenta quatro tipos celulares característicos com suas principais funções: os melanócitos (produção de melanina), células de Langerhans (apresentadoras de antígenos), células de Merkel (mecanorreceptores), e os queratinócitos

(produção de queratina) que são células mais abundantes da epiderme, com 95% do total (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A epiderme está organizada em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. Em regiões onde a pele é mais espessa, como a sola dos pés, a epiderme chega a apresentar cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal ou germinativa consiste de uma única camada de queratinócitos sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. Ela apresenta intensa atividade mitótica sendo responsável junto com a camada espinhosa, pela constante renovação da epiderme. A camada granulosa apresenta grânulos lamelares formados por bicamada lipídica, que contribuem para formar uma barreira contra a penetração de substâncias e tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo. A camada lúcida é constituída por uma delgada camada de células achatadas e é mais evidente na pele espessa. A camada mais superficial é a córnea, de espessura variável, formada por células cujo citoplasma é repleto de queratina. A expressão de queratina pela camada de células é observada durante a diferenciação dos queratinócitos (BARANOSKI; AYELLO, 2004; GARTNER; HIATT, 2003; KIERSZENBAUM, 2004).

3.1.2 - Derme

Abaixo da epiderme, localiza-se a derme, onde apresenta uma espessa camada de tecido conjuntivo que une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. Sua espessura é variável de acordo com a região observada, atingindo um máximo de 3 mm na planta dos pés. Sua superfície externa é bastante irregular, apresentando saliências chamadas de papilas dérmicas, que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (GRAY, 1988).

A derme apresenta duas camadas: a papilar, constituída de tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas delgadas) em contato com a epiderme; e a reticular, constituída por tecido conjuntivo denso contendo feixes espessos de fibras colágenas e elásticas. Esse tecido é responsável por algumas funções, como sustentação estrutural, nutrição, defesa, preenchimento, transporte (meio para trocas) e reparo tecidual (GARTNER; HIATT, 2003).

O tecido conjuntivo é composto por uma matriz extracelular e dois tipos de células, as fixas, que quando desenvolvidas permanecem no próprio tecido, como fibroblastos (mais abundante), mastócitos, macrófagos e células adiposas; e as transitórias, quando recrutadas migram da corrente sanguínea para derme, como plasmócitos, linfócitos, neutrófilos,

eosinófilos, basófilos, monócitos e macrófagos (GARTNER; HIATT, 2003). Na derme também são encontrados vasos sanguíneos, linfáticos, nervos cutâneos sensitivos, e algumas estruturas derivadas da epiderme, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas (BARANOSKI; AYELLO, 2004; SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

3.1.3 – Hipoderme

Tecido sobre o qual a pele repousa, formado por tecido conjuntivo que varia do tipo frouxo ou adiposo de espessura variável, também chamada de panículo adiposo. A hipoderme conecta frouxamente à pele e à fáscia dos músculos subjacentes, o que permite aos músculos contraírem-se sem repuxar a pele. Essa região tem a função de reserva energética, isolamento térmico e proteção mecânica do corpo às agressões físicas externas (SAMPALIO; RIVITTI, 2001).

A formação da úlcera ocorre quando apresenta ruptura na solução de continuidade do tecido cutâneo-mucoso atingindo a camada epidérmica e pelo menos a derme papilar, alterando a estrutura anatômica e/ou fisiológica, sendo classificada como aguda ou crônica (LEITE, 2009).

3.2 – Úlceras Agudas

As úlceras agudas, como as cirúrgicas e traumáticas, cicatrizam de modo rápido e organizado, através de um processo biológico complexo, apresentando eventos de maneira coordenada e sequencial envolvendo interações de vários tipos celulares proteases, componentes da matriz e citocinas (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Nessas úlceras, na fase inflamatória ocorre um equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias fazendo com que o processo inflamatório seja limitado (MENKE et al., 2007).

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, chegando ao tecido celular subcutâneo. Existem dois tipos de ferida: a ferida de espessura parcial, onde a reparação faz-se pela repitelização dos anexos epiteliais ou epitélio da região não acometida, apresentando uma cicatriz imperceptível; o outro tipo de ferida é a de espessura total, precisam de reepitelização, através da formação de tecido de granulação, não somente nas margens da ferida, nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

3.3 – Reparo Tecidual

O Reparo tecidual pode ocorrer por duas vias, como mostra a Figura 2, a da regeneração, que é o reparo tissular por células idênticas às lesadas, e a da substituição por tecido conjuntivo (fibroplasia ou fibrose), com perda funcional do tecido acometido e posterior formação de cicatriz (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Figura 2 - Reparo tecidual por regeneração e por fibrose
Fonte: Cotran, Kumar e Collins (2000)

3.3.1 – Cicatrização

O Processo cicatricial (fibrose) ocorre quando as células parenquimatosas e a matriz extracelular são acometidas e impossibilitadas de gerar novos tecidos. Na tentativa da reestruturação da parte lesada o organismo sofre um processo complexo e dinâmico desencadeado por sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios no local da lesão. Esse processo resulta no preenchimento da lesão por tecido conjuntivo, que produz fibrose e posterior cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURY, 2005).

A cicatrização é constituída por uma série de eventos sobrepostos (Figura 3) que envolvem 4 fases: coagulação, inflamatória, fibroplasia e remodelamento (STEED, 2003), embora alguns autores apresentem o processo em cinco (BEANES et al., 2003) ou em apenas 3 fases (GURTNER et al., 2008).

Figura 3 - Fases da cicatrização de feridas
Fonte: Cotran, Kumar e Collins (2000)

Fase de Coagulação

O rompimento da solução de continuidade tecidual proporciona um extravasamento de constituintes como plasma, plaquetas, fibrinogênio e fibrina para a matriz extracelular. Esse processo é o primeiro momento de liberação de sinalizadores para ocorrer o reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURY, 2005; BEANES et al., 2003).

A coagulação ou homeostasia ocorre logo após a lesão, a partir de uma resposta vasculomotora imediata que permite o estancamento do sangue. A vasoconstrição é mediada pela descarga adrenérgica e pela degranulação de mastócitos (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

Em seguida, ocorre uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade dos capilares, o que contribui para a adesão leucocitária no endotélio e para o extravasamento de mediadores pró-inflamatórios. Para ativar os eventos sequenciais da coagulação sanguínea, as plaquetas iniciam um processo de agregação devido a exposição de colágeno subendotelial (LI; CHEN; KISNER, 2007; WITTE; BARBUL, 1997).

Um trombo (coágulo) é formado por plaquetas agregadas que tampona temporariamente a lesão endotelial. Esse coágulo juntamente à trombina, à fragmentos

plaquetários e à fibronectina libera citocinas, fatores de crescimento, como Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Fibroblasto (FGF), Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), Fator de Agregação Plaquetária, liberando também serotonina, histamina e bradicinina (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

As plaquetas agregadas, incrementadas por fibrina, atuam como um importante gradiente químico sinalizador de células inflamatórias, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais (LI; CHEN; KISNER, 2007).

Fase Inflamatória

Na fase inflamatória os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio da lesão em até 24 horas, sua principal ação é a fagocitose de restos celulares, micro-organismos e agentes estranhos à ferida (FUJIMAKI et al., 2003). Com o aumento da permeabilidade vascular e por um gradiente de substâncias quimioestáticas, como fatores de complemento, IL - 1 β , Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), TGF - β , Fator Plaquetário 4 (PF - 4) e produtos bacterianos é ativada a proliferação das células inflamatórias (WITTE; BARBUL, 1997).

Os Monócitos migram do interior dos vasos sanguíneos até o espaço tecidual e diferenciam-se em macrófagos, esse tipo de célula é abundante na fase inflamatória após 48 horas aproximadamente. Os macrófagos atuam auxiliando os neutrófilos na fagocitose de resíduos de tecidos e de células, debridam a ferida e liberam peptídeos (IL - 1 β e TNF - α) às células T auxiliares, ou seja, os linfócitos (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Os macrófagos são considerados as células reguladoras mais importantes da reação inflamatória, com importante papel nas fases da cicatrização como mostra a Figura 4. Além de fagocitar, digerir, e destruir organismos patógenos, também são responsáveis pela quimiotaxia (PDGF e TGF - β como sinalizadores) de fibroblastos e subsequente síntese e degradação de colágeno que permitem induzir a angiogênese e formação de tecido de granulação (BALBINO; PEREIRA; CURY, 2005).

Figura 4 - Importantes funções dos macrófagos nas fases do processo de cicatrização

Fonte: Witte e Barbul (1997)

A enzima Óxido Nítrico Síntase Induzida ao ser estimulada por citocinas e células pró-inflamatórias (linfócitos), ativa o Óxido Nítrico que é sintetizada pelos macrófagos (WITTE; BARBUL, 1997). Na transição dessa fase para a fase proliferativa da cicatrização, é de fundamental importância que os macrófagos estejam ativados (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

Fase Proliferativa

A fase proliferativa geralmente ocorre três dias pós-lesão, é caracterizada pela proliferação de fibroblastos, células endoteliais, além da presença dos principais mediadores como as citocinas e fatores de crescimento (PDGF e EGF) (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

A matriz extracelular composta por fibronectina e ácido hialurônico é suporte necessário para receber os fibroblastos onde se proliferam e permite a fibroplasia. Esse fenômeno é caracterizado pela síntese de colágeno, iniciando assim, a deposição e agregação dessas fibras o que torna o tecido conjuntivo mais resistente (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998; STARKEY, 2001).

A angiogênese local ocorre simultaneamente a fibroplasia, essa neovascularização ocorre pelo estímulo de receptores de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o

Fator de Crescimento Fibroblásticos (FGF) que se encontram no endotélio de vasos não-lesados e fornece o suporte nutricional dos fibroblastos (GILLITZER; GOEBELER, 2001). As células endoteliais migram e formam novos tubos capilares no leito da lesão após secretar colagenase e degradar os ativadores de plasminogênio (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002).

Após ocorrer a angiogênese e fibroplasia, o tecido de granulação é formado, esse novo tecido exerce papel de preenchimento e sustenta a migração de fibroblastos e queratinócitos da borda ao centro da lesão, os quais são proliferados por estímulos do TGF – β , caracterizando a fase de reepitelização (BALBINO; PEREIRA; CURY, 2005).

A contração da lesão ocorre pela reepitelização e pela aproximação de suas bordas, realizada por miofibroblastos que estão acumulados nas margens das úlceras onde executam atividades contráteis, garantindo o movimento centrípeto das bordas (WITTE; BABUL, 1997).

A maturação é o último processo que ocorre nessa fase, onde os fibroblastos instalados no leito da lesão realizarão a síntese de colágeno, que tornará o principal componente da nova matriz. A deposição de fibras colágenas é fundamental à resistência do tecido neoformado. O tecido de granulação altamente vascularizado torna-se uma massa fibrótica avascular e acelular, denominada Cicatriz (JORGE, 2009).

Fase de Remodelamento

Segundo Karukonda et al. (2000), na fase de remodelagem tecidual ocorre um equilíbrio entre síntese e degradação do colágeno depositado através da ação das colagenases; essas enzimas são controladas por citocinas e fatores de crescimento liberados pelos fibroblastos (TNF, IL - 1 β , PDGF, TGF – β) e o colágeno tipo 3, predominante nas fases da cicatrização de feridas, é substituído em sua maioria pelo colágeno tipo 1, abundante em pele não-lesada e há uma remodelagem dessas fibras de acordo com a direção das tensões aplicadas no tecido. A cicatriz atinge definitivamente sua máxima resistência após o terceiro mês, que corresponde a 70% a 80% da pele saudável (BROUGHTON; JANIS, 2006).

No reparo tecidual são utilizadas técnicas e métodos terapêuticos como, por exemplo, materiais tópicos (farmacologia), curativos biológicos ou não (Biomateriais), tratamentos utilizando a eletrotermofototerapia, entre outras, todas com o objetivo de acelerar cicatrização (Figura 5).

Figura 5 – Formas de cicatrização
 Fonte: Gurtner et al. (2008)

Os efeitos da laserterapia nos eventos celulares, que ocorrem durante a cicatrização de lesões agudas da pele, são importantes no entendimento dos mecanismos que agem nesse processo. Estes estimulam a atividade celular, conduzindo à liberação de fatores de crescimento por macrófagos (YOUNG et al., 1989), proliferação de queratinócitos (YU, et al., 1996), aumento da população e desgranulação de mastócitos (EL SAYED; DYSON, 1996) e angiogênese (TUNER; HODE, 1999). Esses efeitos podem levar a uma aceleração no processo de cicatrização de lesões, devido, em parte, à redução na duração da inflamação aguda, resultando em uma entrada mais rápida no estágio proliferativo de reparo, quando o tecido de granulação é produzido.

3.4 - Matriz Dérmica Acelular

Lesões com espessura total da pele em grande escala não podem ser reparadas de forma espontânea. Portanto, com a substituição de um equivalente tecido dérmico pode desempenhar um papel fundamental na regeneração da pele. Apesar da aplicação mais comum na clínica tradicional ser o auto-transplante, pode apresentar limitações de tempo, espaço, os doadores e antigenicidade. Sendo mais importante, o fornecimento suficiente de pele autóloga é frequentemente limitada (LIE et al., 2007).

Varias técnicas de substituição tecidual foram introduzidas com a finalidade de reduzir a formação de cicatrizes, acelerar o tempo de cicatrização e induzir uma cicatrização mais eficiente (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000).

Qualidades básicas da derme e epiderme são necessárias para ser uma cobertura ideal de pele, tais como: aderência; perda de água controlada; elasticidade; durabilidade; ser uma barreira bacteriana; atóxica e não antigênica; anti-séptica; hemostática; de fácil aplicação e remoção; relativamente de baixo custo (JAKSIC; BURKE, 1987).

A utilização de materiais, naturais ou sintéticos, para o reparo de tecidos vivos vem se desenvolvendo durante as últimas décadas, para compreender melhor os mecanismos de interação do material com os tecidos humano. A engenharia de tecidos proporciona uma potencial fonte de terapias avançadas para tratamento de lesões na pele por apresentar resultados comparáveis com os métodos tradicionais. Ge, Zheng e Wei (2008), compararam a diferença da estrutura histológica e biocompatibilidade entre matriz dérmica acelular porcina e humana. Onde concluíram que matriz dérmica acelular de suínos tem uma forte semelhança com matriz dérmica acelular de humanos, e pode ser um substituto para a matriz dérmica acelular humana, visto que fisiologicamente são semelhantes.

Membranas e hidrogéis provenientes de colágeno vêm sendo investigadas pelas suas potenciais aplicações no campo dos biomateriais (PENG et al., 2006). Colágeno é o biopolímero mais abundante nos animais sendo a proteína estrutural que compõe várias matrizes extracelulares como tendões, ossos e peles (PARK, 1984).

O colágeno é o biomaterial de origem natural mais utilizado devido a algumas características bem conhecidas como a biocompatibilidade (SANTARELLI; PARODI; CARUSI, 1996), quimiotaxia para fibroblastos, ativação e atração de neutrófilos e ampla disponibilidade (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001).

Existem várias aplicações clínicas do colágeno, como por exemplo: no sistema para liberação controlada de drogas (LEE et al., 2000), como matrizes carreadoras na engenharia

de tecidos, como materiais de preenchimento no reparo ósseo (GASQUE et al., 2008), como agente hemostático, na confecção de enxertos para as mais diversas especialidades médicas como, por exemplo, no tratamento de queimaduras, como barreira física na regeneração tecidual (BOUCARD et al., 2007). Feng e colaboradores (2007) descobriram que a aplicação da matriz dérmica acelular xenogenética (suína) em queimaduras de segundo grau pode restaurar a temperatura corporal normal mais rapidamente e estabilizar os sinais vitais.

Dentre essas aplicações estão os *patches* biológicos que são obtidos através de tecidos dérmicos, onde ocorre a remoção de seus componentes celulares tornando-os acelulares, pois são as células as responsáveis pela ativação da resposta imunológica. A ausência das estruturas celulares provoca pouca inflamação, não levando a rejeição do tecido transplantado (LIVESEY et al., 1995).

Esses *patches* reforçam os tecidos moles durante o processo de cicatrização e fornece uma matriz de colágeno para o crescimento celular. Os *patches* são obtidos a partir de vários materiais como, pericárdio porcino ou bovino, tecido de cadáver humano adulto, submucosa de intestino delgado de porco, derme de feto bovino, entre outros (RUBIN; SCHWEITZER, 2005).

Ramos (2004) analisou histologicamente a integração da matriz dérmica na regeneração. Separou os animais em três grupos, sendo eles, Grupo Implante de Matriz Dérmica, Grupo Enxerto Autólogo e Grupo Cicatrização por Contração. As análises mostraram significância para a presença de neutrófilos, neoformação dérmica, formação de canais vasculares, deposição de colágeno e formação de fibrose. O grupo da matriz dérmica mostrou os melhores resultados, com menor processo inflamatório, menor formação de fibrose, maior deposição de colágeno, maior neoformação dérmica e maior formação de canais vasculares.

A combinação de biopolímeros é importante na área de biomateriais, sendo possível juntar as propriedades individuais de cada material em um só, além da possibilidade de melhorar ou controlar as suas propriedades mecânicas e biológicas através da interação entre estruturas químicas diferentes (LACERDA; MARTINS; PLEPIS, 2006).

O pericárdio porcino apresenta potencial para ser utilizado como curativo biológico, pois tem como constituinte principal o colágeno, o qual é muito utilizado por apresentar propriedades como baixa antigenicidade, atoxicidade e biocompatibilidade (HATTORI et al., 2006; LEE; SINGLA; LEE, 2001) e é passível de modificações. O que o torna mais atrativo é a sua grande disponibilidade e baixo custo. Entretanto, esse curativo tem uma biodegradação

rápida e frequentemente necessita ser reticulado para aumentar o tempo de permanência e em geral são utilizadas substâncias citotóxicas como glutaraldeído.

Assim, a adição de quitosana pode diminuir a taxa de degradação, pois a collagenase degrada mais rápido o colágeno do que quitosana *in vivo*, além, de melhorar as propriedades mecânicas (RODRIGUES et al., 2010).

A quitosana é um polímero natural proveniente da reação de desacetilação da quitina, um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza. A quitina é proveniente principalmente de exoesqueletos de crustáceos e artrópodes (TOMALAIMATE et al., 2000). Todas as propriedades físico-químicas apresentadas pela quitosana (solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outros) dependem do seu grau de acetilação e da distribuição de cargas ao longo da cadeia.

Para a engenharia de tecidos a quitosana apresenta diversas características de interesse, como ação antimicrobiana e redutora do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais, por ferimentos ou queimaduras (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000). É capaz de acelerar a regeneração tecidual, síntese de colágeno a partir dos fibroblastos, também tem funções de hemostasia e esterilização. Portanto, uma matriz dérmica porosa composta de colágeno e quitosana possui a funcionalidade de infiltração, proliferação e diferenciação de fibroblastos, e pode acelerar a vascularização *in vivo* (CHO et al., 1999; LIE et al., 2007).

Plepis e colaboradores (2009) prepararam matrizes de colágeno acelular derivados de pericárdio porcino por hidrólise alcalina e avaliaram sua citotoxicidade e biocompatibilidade. Após os procedimentos observaram que as matrizes não são citotóxicas para células tumorais humanas e os fibroblastos de ratos, que foram as células avaliadas. A partir da análise histológica observaram boa biocompatibilidade e baixa resposta inflamatória.

Sun et al. (2009) fabricaram matrizes tridimensionais de colágeno e quitosana e os resultados mostraram que houve interação dos fibroblastos com essas matrizes, e os fibroblastos apresentaram melhor capacidade de proliferação e atividade biológica na matriz tridimensional do que na de monocamada. Observaram também que as matrizes tridimensionais são bioestáveis e citocompatíveis.

3.5 – Laser de Baixa Intensidade

3.5.1 – Histórico

O termo *LASER* é um acrônimo de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, que significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação” (BAXTER, 1997; LOW; REED, 2001). Albert Einstein em 1916 foi o primeiro a postular o fenômeno físico da emissão estimulada de radiação. Com base nesse princípio, Townes, Gordon e Zeiger, em 1951, construíram um instrumento para emitir radiação na faixa de microondas que ficou conhecido como *MASER* ou Amplificador de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação, surgindo então, a possibilidade de trabalhar na região do espectro visível (KLOTH, 1997).

A primeira proposta da produção da radiação *laser*, com um material sólido utilizando o cristal de rubi, dentro da faixa vermelha do espectro eletromagnético, foi em 1960, por Dr. Theodore H. Maiman. Por volta dos anos 60 Javan, Bennett e Herriott construíram o *laser* de hélio-neônio (He-Ne), tornando-se a primeira fonte de luz coerente disponível comercialmente, recebendo o nome de *cold laser* ou *soft laser* (TUNER; HODE, 1999). Karu (1989) acreditava que os efeitos bioestimulatórios observados pelo *laser* He-Ne eram atribuídos a alta coerência.

Com a descoberta do *laser* He-Ne surgiu o interesse em produzir um equipamento na faixa do infravermelho. No entanto, esses aparelhos apareceram no final da década de 70 com o surgimento da tecnologia dos diodos semicondutores que possibilitou a confecção de equipamentos de arsenieto de gálio (AsGa) e de arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl) (OHSHIRO, 1991).

Os primeiros trabalhos com aplicações clínicas da bioestimulação com *laser* foram apresentados pelo professor húngaro Endre Mester, de Budapeste, em 1966. Ele utilizou *laser* na cicatrização de úlceras, onde foram observados os efeitos dessa radiação na modulação dos processos biológicos. A partir daí, a terapia *laser* de baixa intensidade foi ativamente estudada, principalmente na União Soviética e na Europa Oriental (SIMUNOVIC; IVANKOVICH; DEPOLO, 2000).

Ohshiro e Calderhead em 1988 criaram o termo *Low reactive – Level Laser* ou *Low Level Laser Therapy* (LLLT – Terapia *Laser* de Baixa Intensidade) tornou-se internacionalmente aceito para descrever tratamentos realizados com a aplicação de *laser*. Após 10 anos, Calderhead propôs a terminologia *Laser Therapy* (OHSHIRO; FUJINO, 1993).

Após esse momento, iniciaram pesquisas e experimentações utilizando *laser* de baixa intensidade em diversas doenças, apresentando, assim mais conhecimentos sobre os efeitos fisiológicos, mecanismos de ação e aperfeiçoamento dos aparelhos (BAXTER et al., 1991).

3.5.2 - Propriedades e Comportamento da Radiação Laser

De acordo com Tuner e Hode (1999), a emissão de luz *laser* possui as características gerais da luz comum, podendo ser refletida, refratada e absorvida ao atingir a matéria. As características que a diferenciam estão relacionadas ao processo de sua produção, ou seja, a emissão estimulada de radiação, sendo elas: a monocromaticidade, a coerência, a colimação e a polarização.

A característica de monocromaticidade indica que a radiação é constituída de fótons com um único comprimento de onda, onde determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente e, portanto, a interação fotobiológica e dos efeitos terapêuticos específicos (KITCHEN; BAZIN, 1996; ORTIZ et al., 2001a).

A Radiação *laser* apresenta a sincronicidade das ondas de luz, ou seja, os picos e as depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo (coerência temporal) e na mesma direção (coerência espacial) (BAXTER, 1997).

A luz *laser* possui a propriedade de unidirecionalidade, ou seja, a colimação, onde consiste no alto grau de paralelismo do feixe *laser* indicando uma discreta divergência angular, de tal forma que a luz mantém um pequeno tamanho de saída do feixe por uma longa distância. Esta característica é responsável pelos perigos oculares gerados pelo *laser* (LOW; REED, 2001).

A propriedade onde caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si, determina a polarização, que ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, de uma maneira que as vibrações em seus campos elétricos acontecem em uma única direção (RIBEIRO et al., 2004).

3.5.3 - Princípios do Equipamento Laser

A produção da radiação *laser* ocorre quando um átomo encontra-se em seu estado excitado, onde elétrons podem retornar pra níveis mais baixos de energia a partir da estimulação por um fóton incidente. Quando o elétron sofre esse salto quântico e retorna para a sua órbita original, elimina seu excesso de energia na forma de um fóton de luz, com as

mesmas características do fóton incidente. Essa emissão estimulada de radiação sofre um efeito de amplificação, proporcionando uma grande quantidade de fótons idênticos por meio da rápida excitação do meio gerador da radiação (LOW; REED, 2001).

Um fóton é formado através da quantidade de energia liberada, que determina o comprimento de onda da luz emitida, que apresenta uma relação inversamente proporcional, ou seja, comprimentos de onda curtos estão relacionados com fótons carreando altas quantidades de energia (BAXTER, 1997).

Existe uma classificação dentro de um espectro eletromagnético, onde uma grande variabilidade de carga energética dos fótons determina a existência da quantidade de radiações. Os *lasers* terapêuticos ou de baixa intensidade, encontram-se em uma faixa de espectro variando entre o visível e o infravermelho. Para tratar de tecidos biológicos foi estabelecido o intervalo espectral conhecido como, “janela terapêutica”, onde os comprimentos de ondas estão entre 630 a 980nm (nanômetros) (KITCHEN; BAZIN, 1996).

3.5.4 – Parâmetros da Irradiação

Os equipamentos de *laser* apresentam vários parâmetros, sendo eles: a potência óptica, o comprimento de onda, a densidade de potência (ou irradiância), a fluência (densidade de energia ou dosimetria), o tipo de feixe e a frequência do tratamento (LOW; REED, 2001).

Potência óptica útil (P) é a energia emitida em um segundo, cuja unidade é expressa em Watts (W) ou em miliWatts (mW). Os *lases* terapêuticos comumente operam com potências de saída inferiores a 1W (BAXTER, 1997).

O comprimento de onda (λ) é determinado pela distância entre dois picos ou dois vales de cada onda, assim sendo, é a distância percorrida por um ciclo, e a unidade que o representa é uma fração de metros, expressa em nanômetros (nm). Este parâmetro determina quais biomoléculas absorverão a radiação, que o torna fator determinante dos efeitos fisiológicos (KARU, 1998; KITCHEN; BAZIN, 1996).

Densidade de potência consiste na potencia de saída da luz por unidade de área de irradiação, normalmente expressa em mW/cm^2 ou W/cm^2 . Esse parâmetro geralmente é mantido em nível mais alto quando se utiliza a técnica de tratamento por contato, tendo em vista a ocorrência de maior concentração de fótons por unidade de área quando comparada ao uso sem contato com tecido alvo (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Fluência é a energia total transmitida por um feixe *laser* por unidade de área e expressada em J/cm^2 . Para calcular a fluência utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Fluência (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{potência (W)} \times \text{tempo (s)}}{\text{área de irradiação (cm}^2\text{)}}$$

Para a laserterapia a fluência ideal ainda permanece controversa. As faixas usuais vão de 1 à $10\text{J}/\text{cm}^2$ e são utilizadas doses tão baixas quanto $0,5\text{J}/\text{cm}^2$ e altas como $32\text{J}/\text{cm}^2$ (LOW; REED, 2001).

Tem sido sugerida a existência de uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione uma fotoinibição. Esse conceito foi denominado como Lei de Arndt-Schultz (Figura 6), onde a existência de um efeito dose-dependente representado por uma curva fluência *versus* resposta biológica (LONGO; MESTER, 1998; TIPHLOVA; KARU, 1987).

Figura 6 - Esquemática da lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa o repouso, (b) a bioestimulação e (c) a bioinibição.

Fonte: Baxter (1997)

O tipo de feixe depende do sistema *laser* e de sua configuração, podendo operar de modo pulsado ou contínuo (BAXTER, 1997). Quanto à frequência de tratamento ideal, este parâmetro ainda não se encontra determinado na literatura científica, de modo que existem estudos que foram realizadas apenas uma ou duas aplicações, com objetivo de verificar os efeitos específicos sobre uma atividade biológica (KARU, 1989; LOW; REED, 2001).

3.5.5 - Penetração da Luz nos Tecidos

Durante a interação da radiação *laser* com o tecido biológico, ocorrem eventos de reflexão, refração, dispersão e absorção (Figura 7) (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). Na superfície do estrato córneo ocorre a primeira interação da luz, onde cerca de 5% a 7% da radiação incidente é refletida (PARRISH; DEUTSCH, 1984). O restante da porcentagem desta radiação penetra nos tecidos seguintes e são dispersos por reflexão interna, refração, divergência e ainda diminuída por absorção. Essa reflexão interna pode ocorrer devido aos tecidos mais profundos não serem homogêneos (LOW; REED, 2001).

Figura 7 - Interação da luz laser com os tecidos
Fonte: Adaptado por Ribeiro (2000)

Embora ocorra uma diminuição no efeito da radiação em proporção direta a sua penetração, a extensão da ação fotoquímica permite atuar indiretamente em estruturas mais profundas, iniciando de forma mais superficial, expandindo para efeitos mais profundos e até sistêmicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; OSHIRO, 1991).

3.5.6 - Mecanismo dos Efeitos da Fotobioestimulação

Segundo Parrish, Rosen e Gange (1985), as biomoléculas específicas quando absorvem a energia laser, alcançam um estado de excitação eletrônica, sendo capazes de

sofrer reações químicas como oxidações, redução, isomerização, ruptura de ligações covalentes ou interações com outras biomoléculas.

Os mecanismos da fotoestimulação nos tecidos são complexos e ainda não estão totalmente esclarecidos. Karu (1988) foi a primeira a relatar os mecanismos de interação do laser com o tecido, a nível molecular. Os mecanismos podem acontecer através da excitação das cadeias de elétrons mitocondriais e pode gerar reações químicas induzindo um efeito biológico; vibrações moleculares geradas pela absorção da irradiação infravermelha e causa deslocamentos dos núcleos atômicos; e a rotação total ou parcial da biomolécula ao redor de um eixo gerado pelo campo eletromagnético da luz incidente e leva a um discreto aumento da temperatura.

O espectro da região visível apresenta os efeitos termais e fotoquímicos, a radiação ultravioleta somente apresenta ação fotoquímica e ação térmica para a faixa infravermelha (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Os efeitos da fotoestimulação são baseados em mecanismos não-termais, que não geram um aumento significativo da temperatura dos tecidos (WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Nos estados de excitação eletrônica, uma importante fração de energia excitada é convertida em calor, que provoca o aumento na temperatura dos cromóforos absorventes. Contudo é observado o aquecimento local e transitório das moléculas absorventes, diferente do aquecimento celular total (KARU, 1995).

A aplicação de energia eletromagnética pelo laser de baixa intensidade nos tecidos biológicos refere-se à bioestimulação a laser, que pode influenciar as funções celulares com a estimulação ou a inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Como apresenta efeitos de estimulação ou inibição, ultimamente é usado o termo biomodulação ou fotobiorregulador (KIPSHIDZE et al., 2001).

Com a tentativa de explicar o efeito bioestimulante do laser surgiram algumas teorias. A primeira delas foi o princípio de Arndt-Schultz, o qual propõe que os tecidos reagem à quantidade de energia absorvida por unidade de tempo, de tal forma que a atividade fisiológica é excitada quando estímulos são fracos e é inibida quando os estímulos são fortes (KLOTH, 1997).

Atualmente, a teoria fotoquímica é mais estudada e fundamentada, explicando a sensibilidade das células à luz laser. Essa teoria considera que a conversão em energia fotoquímica ocorre a partir da estimulação das moléculas fotoreceptoras ou cromóforos por uma energia eletromagnética (ORTIZ et al., 2001b).

Em 1999, Karu discutiu que o citocromo c oxidase (Complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) poderia ser o fotorreceptor primário da fotoestimulação e que dependendo do comprimento de onda situado na região do visível e do infravermelho próximo (630-1000nm), esse mecanismo pode diferenciar suas ações. A fotobiomodulação ativa a cadeia respiratória após a absorção da luz no citocromo c oxidase, aumentando a transferência de elétrons e o metabolismo oxidativo da mitocôndria, o que aumenta a geração de espécies de oxigênio reativo, tornando moléculas sinalizadoras para promover a comunicação entre mitocôndria, citosol e núcleos.

As reações primárias das moléculas fotorreceptoras levam às respostas fotobiológicas a nível celular (mitocôndria) através de cascatas das reações homeostáticas e bioquímicas, como as mudanças no estado redox e aceleração na transferência de elétrons; o aumento da produção de superóxido e geração de oxigênio molecular (KARU, 1999; KITCHEN; PRATRIDGE, 1991).

Para que ocorram as reações das moléculas fotorreceptoras, inicialmente as células absorvem os fótons e os transforma em adenosina trifosfatos (ATP), que será utilizada nos processos metabólicos, síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas e enzimas, necessários para o reparo ou regeneração dos componentes celulares, acelerar mitose ou proliferação celular e restaurar a homeostasia (KARU, 2003; SILVEIRA; STRECK; PINHO, 2007).

Na sequência, inicia-se uma cascata de reações bioquímicas e/ou biofísicas no citoplasma e na membrana celular, onde os mecanismos secundários de ação correspondem à transdução do fotossinal e a amplificação ao núcleo, esses mecanismos podem acontecer minutos ou horas após a irradiação e parecem ser regulados pelo estado redox intracelulares (estado óxido-redutivo da célula) (KARU 2000; KARU; PYATIBRAT; KALEND, 1995).

O laser tem melhores efeitos sobre órgãos com desordem funcional ou lesão tecidual (TUNER; HODE, 1999). No caso de uma baixa concentração de oxigênio e queda do pH, levando a alteração do estado redox celular, ocorrerá influência na resposta biológica a irradiação (KARU, 1995).

Efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos gerados pelo laser, afeta não só a área de atuação, mas também as regiões circundantes (TUNER; HODE, 1999). Segundo Karu (1998) os efeitos fotobiológicos podem ser divididos em curto prazo e em longo prazo à irradiação.

O efeito do laser em curto prazo pode ser observado em poucos segundos ou minutos após a irradiação. Entre elas, está a fotoestimulação da taxa respiratória e a síntese de ATP.

Os efeitos em longo prazo são observados por horas ou dias após o término da irradiação. Os principais efeitos fisiológicos são: efeito antiinflamatório, efeito analgésico e efeito cicatrizante (KARU, 1998).

Os aspectos da cicatrização de úlceras utilizando a fototerapia estão sendo relatados em estudos *in vitro* como a proliferação de fibroblasto (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006), estimulação de macrófagos (RAJARATNAM; BOLTON; DYSON, 1994), síntese de pró-colágeno (PEREIRA et al., 2002), estimulação de queratinócitos (GROSSMAN et al., 1998) e inibição do crescimento bacteriano (LIBANORE, 2008).

A laserterapia vem sendo utilizada nos processos cicatriciais, visando obter cicatrização mais rápida de feridas. Isso porque induz respostas nos tecidos, como diminuição do processo inflamatório, redução de edema, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (BAXTER, 1997).

Segundo Agaiby et al. (2000), a fototerapia tem sido observada por aumentar e acelerar a neovascularização após lesão tecidual.

Na tentativa de elucidar, os mecanismos de ação e efeitos da fototerapia no reparo tecidual, ampliaram-se as pesquisas utilizando modelos animais (LEITE et al., 2008).

Rezende (2001) analisou o efeito da aceleração do processo de cicatrização de lesões cutâneas em ratos, utilizando diodo *laser* emitindo em 830nm. Todas as lesões irradiadas apresentaram aceleração do processo de cicatrização, com relação ao grupo controle. E a combinação do valor de intensidade de 53mW/cm^2 e da dose de $1,3\text{J/cm}^2$ levaram a resultados ótimos dos pontos de vista biométricos e histológicos, apresentando contração mais rápida da lesão, com maior rapidez na neoformação de tecido conjuntivo e epitelial.

Mendez et al. (2004), compararam histologicamente o efeito dos *lasers* de GaAlAs (830nm, 35mW) e InGaAlP (685nm, 35mW), isoladamente ou em associação com doses de 20 ou 50J/cm^2 em feridas cutâneas no dorso de ratos Wistar. A análise microscópica utilizando HE e Picrosirius mostrou que os indivíduos irradiados apresentaram maior produção e organização de colágeno em relação aos controles não irradiados. O grupo que associou os *lasers* 830nm e 685nm, 20J/cm^2) apresentaram os melhores resultados no final do período experimental, concluindo que a laserterapia pode ter um efeito positivo biomodulatório no reparo de feridas cutâneas.

Marcon e André (2005), observaram os efeitos do *laser* AlGaInP sobre a cicatrização. A ferida cutânea foi induzida cirurgicamente em 20 ratos, divididos em quatro grupos distintos. Os quais três deles receberam a irradiação *laser* vermelho, com 658nm, 10mW e com doses diferentes para cada grupo (3, 6 e 9J/cm^2), além do grupo controle o qual não foi

irradiado. Os resultados revelaram que o *laser* foi eficaz na aceleração do processo de cicatrização, e foi capaz de promover a cicatrização definitiva da úlcera, além dos efeitos antiinflamatórios e bactericidas. Onde a dosimetria de $9\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou melhores resultados, seguido pela dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$, e por último a dose de $6\text{J}/\text{cm}^2$. Concluíram que os três grupos irradiados com *laser* apresentaram resultados significativos, em todos os parâmetros analisados, em comparação ao grupo controle.

Rocha Junior et al. (2006), realizaram um estudo da fototerapia utilizando um aparelho de *laser* Arsenieto de Gálio com 870nm, 15mW de potência e dose de $3,8\text{J}/\text{cm}^2$, três aplicações (dia da cirurgia, 48 horas, 9º dia). A análise histomorfométrica foi feita para contagem de células inflamatórias, avaliação da proliferação fibroblástica, análise da angiogênese local, e do diâmetro das áreas ulceradas no 10º dia pós-operatório com auxílio de marcação digital. Os resultados mostraram que em todas as análises o grupo irradiado apresentou melhores resultados quando comparado com o grupo controle.

Vieira (2006) comparou os resultados obtidos na pesquisa experimental com *laser* de baixa potência, diodo AsGa, comprimento de onda de 660nm, com diferentes doses. Utilizou 54 ratos, divididos em grupos controle, grupos submetidos a laserterapia na dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e grupos submetidos a laserterapia na dose de $8\text{J}/\text{cm}^2$. Concluiu que a radiação com laserterapia de baixa potência, com comprimento de onda de 660nm, nas doses de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$ não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Porém, macroscopicamente houve diferença, em relação à cicatrização total, entre os animais tratados e os não tratados com radiação *laser*.

Meirelles et al. (2008) compararam os efeitos fotobiológicos do *laser* de 660nm e o de 780nm em queimaduras de terceiro grau em ratos diabéticos. Após 21 dias de irradiação observaram que o *laser* de 780nm apresentou melhora do processo inflamatório e aumento da quantidade e qualidade do tecido de granulação, porém não tão eficaz quanto o *laser* de 660nm, que se mostrou mais eficaz no processo cicatricial.

Ribeiro et al. (2009), avaliaram o efeito biomodulatório da laserterapia, em miofibroblastos e células T e B durante a cicatrização de feridas em ratos. Metade deles foi submetida por sete dias à laserterapia com dose total de $20\text{J}/\text{cm}^2$, com 660nm e 40mW. Aos 8 e 14 dias pós-operatório as feridas foram removidas e realizaram imuno-histoquímica de miofibroblastos, células T e células B. Os resultados indicaram que a laserterapia facilitou a diferenciação miofibroblástica durante as fases iniciais do processo de reparo cicatricial. Além disso, modulou a resposta inflamatória regulando a proliferação linfocitária durante o processo de cicatrização de feridas.

Paim et al. (2002), avaliaram clinicamente os efeitos da radiação *laser* AsGa, em

enxertos autólogos de pele na reparação de feridas carpometacarpianas de cães. O tratamento com *laser* (904nm, 45mW) foi realizado sempre no membro esquerdo, imediatamente após a transplantação perdurando por dez dias. Os resultados indicaram diferença significativa em favor dos enxertos tratados com *laser* AsGa quando comparados aos enxertos testemunhas, considerando as variáveis exsudação, coloração e edema. Os autores concluíram que enxertos irradiados exibem uma pega mais avançada no estágio inicial da enxertia.

Prozillo (1998) realizou uma pesquisa onde avaliou a reparação tecidual das feridas cutâneas em ratos após irradiação com Laser de He-Ne e tratamento com polímero de aminoácidos. Um grupo recebeu irradiação com laser He-Ne (8mW de potência, comprimento de onda 632,8nm) e o outro foi tratado com curativo de polímero de aminoácidos. Observou que a atividade de regeneração foi mais evidente nos animais tratados com laser e polímero de aminoácidos do que no grupo controle do próprio animal. Nestas lesões, o desenvolvimento do tecido de granulação foi mais precoce e organizado e a vascularização mais abundante.

Bortot (2005) propôs em seu estudo analisar os efeitos do laser AlGaInP, de 670nm, com dose de $7\text{J}/\text{cm}^2$, aplicando sobre a fita cirúrgica hipoalergênica, no processo de reparação tecidual de feridas cirúrgicas. Foram realizadas as análises histológicas e biomecânicas, onde concluiu que nas análises histológicas os grupos tratados com laser com ou sem fita cirúrgica não apresentaram diferenças significativas, mas em comparação ao grupo controle sem fita apresentaram diferenças significativas. Já nas análises biomecânicas os grupos não apresentaram diferença significante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo foram utilizados 48 ratos, machos, da linhagem Holtzman, com três meses de idade e massa corporal variando de 300 a 350g, obtidos do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara.

Os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento da Bioengenharia da USP/São Carlos, durante todo o procedimento experimental em gaiolas apropriadas de prolipropileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12h, ambiente higienizado, temperatura e ventilação adequadas), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

4.2 - Materiais

4.2.1 - Matriz Dérmica Acelular

A obtenção das matrizes de colágeno derivadas de pericárdio porcino bem como seu revestimento com quitosana foram feitos pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Guzzi Plepis. Para a preparação das matrizes, foram realizados os procedimentos de rotina do laboratório, como parte integrante da tese de doutoramento da aluna Fabiana Tessari Rodrigues e resumidamente descritos a seguir. As matrizes derivadas de pericárdio porcino (Figura 8), foram obtidas por hidrólise alcalina. Para tanto, o pericárdio porcino foi imerso por 24h em uma solução alcalina na presença dos sais de K^+ , Na^+ e Ca^{++} a 25°C, seguido de solução contendo cloretos e sulfatos de K^+ , Na^+ e Ca^{++} por 6h sendo em seguida de lavado com ácido bórico 3%, EDTA 0,3% a pH 11 e água desionizada até pH constante (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). As matrizes após hidrólise alcalina foram equilibradas em tampão fosfato 0,13 mol L⁻¹, pH 7,4, lavadas com água desionizada e liofilizadas, obtendo assim matrizes com cargas negativas.

A quitosana utilizada foi obtida do gládio da lula da espécie *Loligo* pelo procedimento descrito por Kurita et al. (1993), consistindo resumidamente de desmineralização da β -quitina com HCl 0,55M a 25°C por 2h; desproteinização por tratamento com NaOH por 1h a 80°C; desacetilação em solução aquosa de 40% (m/m) de NaOH a quitina, 80°C por 3h sob fluxo de nitrogênio e agitação. A solução de quitosana foi feita na concentração de 1% em ácido acético 1%.

Parte das matrizes de pericárdio, após a hidrólise alcalina e liofilização, foram recobertas (revestidas), à temperatura ambiente, com uma fina camada da solução de quitosana e então novamente liofilizadas (RODRIGUES et al., 2010).

Figura 8 – Foto digital da matriz acelular de pericárdio porcino

As matrizes de pericárdio porcino com e sem recobrimento com quitosana foram caracterizadas por DSC, TG e MEV (Figura 9) (RODRIGUES et al., 2010).

Figura 9 – Caracterização por MEV da matriz de pericárdio porcino (A) e da matriz de pericárdio porcino revestida com quitosana (B)
(Fonte: Rodrigues et al., 2010)

Os dados de análise térmica mostraram que a presença de quitosana interfere pouco na temperatura de desnaturação do colágeno, com uma diminuição de 1,4°C, tendo-se Td de 58,4°C para matriz de pericárdio porcino e de 57,0°C após recobrimento com quitosana. Estes resultados mostram que a estrutura de hélice tripla do colágeno foi preservada sem alteração na estabilidade térmica. A termogravimetria indica uma diminuição na hidrofiliicidade verificada pela menor quantidade de água presente na matriz após o recobrimento com a quitosana. As fotomicrografias mostraram que a quitosana está uniformemente distribuída na matriz apresentando uma estrutura bem mais densa quando comparada com a matriz antes do recobrimento.

A matriz foi esterilizada com óxido de etileno na empresa Acecil Central de Esterilização Com. Ind. Ltda, Campinas/SP, realizada pelo Dr. Manuel Marcos.

4.2.2 - Equipamento Emissor da Radiação Laser

A fonte de luz utilizada neste estudo foi o Twin Laser, da marca MM-Optics[®] (Figura 10). Esse equipamento possui dois comprimentos de onda, no espectro eletromagnético vermelho e infravermelho. Foi utilizado somente o comprimento de onda vermelho.

Figura 10 - Laser Terapêutico da marca MM-Optics[®], onde a seta indica a ponteira

No início e no final do procedimento experimental, a potência de emissão da fonte de luz *laser* foi aferida no Grupo de Óptica do Instituto de Física da USP – São Carlos, por meio de um equipamento Laser Power / Energy Monitor calibrado pelo NIST (National Institute of Standards and Technology) para a confirmação das doses de energias investigadas.

No mesmo Instituto a aplicação da irradiação foi testada com a matriz isolada antes de sua fixação na úlcera e após a sua queda, utilizando-se de um animal piloto. Esse procedimento foi realizado devido à necessidade de se saber o quanto de luz passava pela matriz. Os resultados obtidos foram que inicialmente, antes da fixação, houve uma queda de 20% da potência e a partir do momento que a matriz se transformou em crosta, ou seja, ao final do período, houve uma perda de 80%.

Os parâmetros do Twin Laser, da marca MM-Optics[®] que foram adotados para este estudo:

- ✓ Comprimentos de onda da luz = 660nm;
- ✓ Potência óptica útil (saída da ponteira) = 40mW;
- ✓ Área do feixe de saída = $0,04\text{cm}^2$;
- ✓ Irradiância = $30\text{mW}/\text{cm}^2$;
- ✓ Tempo por ponto = 30s;

✓ Energia= 1,2J/ponto.

4.3 – Métodos

4.3.1 - *Delineamento Experimental*

Os 48 ratos foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, em 6 grupos, sendo **Ctrl** (controle), **Laser**, **Matriz**, **ML** (matriz/laser), **MQ** (matriz/quitosana), **MQL** (matriz/quitosana/laser). A aplicação do laser foi realizada em 4 pontos, distribuídos nos vértices da lesão, ocorrendo imediatamente após a cirurgia e nos 9 dias subsequentes, em uma única aplicação ao dia. Nas 24h após a última aplicação ocorreu a eutanásia dos animais no 10º dia pós-operatório.

A seguir, estão descritos os cinco grupos experimentais:

Grupo Ctrl (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso, entretanto eles foram mantidos nas gaiolas, para estabelecer uma comparação macroscópica e histológica com os animais tratados.

Grupo Laser (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso, os quais foram mantidos nas gaiolas, recebendo a laserterapia.

Grupo Matriz (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso e aplicação imediata da matriz acelular, os quais foram mantidos nas gaiolas, o curativo foi hidratado duas vezes ao dia com um mistura de soro fisiológico e glicerina.

Grupo ML (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso e aplicação imediata da matriz acelular, os quais foram mantidos nas gaiolas, o curativo foi hidratado duas vezes ao dia com um mistura de soro fisiológico e glicerina e a laserterapia.

Grupo MQ (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso e aplicação imediata da matriz acelular preparada com quitosana, os quais foram mantidos nas gaiolas, o curativo foi hidratado duas vezes ao dia com um mistura de soro fisiológico e glicerina.

Grupo MQL (n = 8): Nestes animais realizou-se a lesão no dorso e aplicação imediata da matriz acelular preparada com quitosana, os quais foram mantidos nas gaiolas, o curativo foi hidratado duas vezes ao dia com um mistura de soro fisiológico e glicerina e a laserterapia.

4.3.2 - Técnica Cirúrgica

Esta pesquisa foi submetida ao comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar (Anexo A). Os animais foram pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corpórea, com uma associação de ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando uma seringa de insulina. Após a indução anestésica os animais foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos quatro membros, foi realizada a tricotomia digital no dorso dos mesmos, e seguida de antissepsia, colocação de campo cirúrgico fenestrado (Figura 11A), expondo a área cirúrgica, respeitando como limites os ângulos inferiores das escápulas.

Procedeu-se a exereses da pele, criando uma ferida cirúrgica quadrada de 1,5 por 1,5cm (Figura 11B), bisturi descartável número 5 e tesoura cirúrgica, semelhante ao modelo experimental utilizado em vários outros estudos, como por Girardi (2005), Hoyama et al. (2005) e Ramos (2004).

Figura 11 - A) Campo cirúrgico demarcado; **B)** Ferida cirúrgica

A Figura 12A, mostra a hidratação da matriz com 1,7 por 1,7cm, na solução fisiológica e posicionada sob leito receptor (GIRARDI, 2005). Em seguida, as Figuras 12B e 12C mostram a sutura a qual foi realizada com 4 pontos simples, utilizando agulha e linha de sutura de seda da Ethicon Div.Oftálmica 4.0 (RAMOS, 2004).

Figura 12 - A) Hidratação da matriz, **B)** sutura; **C)** seu aspecto imediatamente após a fixação

Os animais dos Grupos **Laser**, **ML** e **MQL** receberam imediatamente após o procedimento cirúrgico a radiação *laser*, a qual foi aplicada nas quatro vértices da lesão. Porém para garantir que a mesma fosse realizada sempre nos mesmos pontos, foi confeccionado um molde com 4 circunferências na mesma posição da aplicação inicial.

Nas aplicações foi posicionado sobre o dorso do animal, um filme de policloreto de vinila (PVC), para evitar o contato direto da caneta do *laser* na úlcera, pois a técnica utilizada foi a pontual com contato (Figura 13), sendo o aplicador do equipamento posicionado perpendicularmente ao dorso do animal e as irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário (PAIM et al., 2002).

Figura 13 - Aplicação da radiação *laser* com posicionamento da barreira plástica entre caneta do *laser* e a úlcera

4.3.3 - Avaliação Clínico Fotográfica

No 10º dia pós operatório, os animais foram avaliados clinicamente quanto ao aspecto da cicatrização da pele por meio de fotodocumentação. As imagens foram capturadas com a máquina fotográfica digital Sony® Cyber-Shot DSC-P200 7.2 Megapixels, utilizando resolução de 3.0 megapixels, apoiada por um suporte tipo tripé com 16 cm de altura.

As fotografias foram realizadas com *zoom* de 1,5 vezes, sem *flash*, apenas com a iluminação ambiente da sala, onde dispunha de quatro janelas que permitiam a entrada da luz solar. As fotos foram colhidas e armazenadas para posterior avaliação.

4.3.4 – Estudo Histológico

Com a finalidade de padronizar a coleta da região lesionada, utilizou-se um paquímetro, no intuito de estabelecer 1cm de largura a partir da região central da lesão, adotando-se como referência a margem direita da mesma.

Após a coleta, as peças permaneceram em solução de formaldeído tamponado a 10% para fixação, durante 24 horas. Depois disso, conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, com banhos seriados em soluções de álcool e xilol. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina, em sentido longitudinal, e cortadas com espessura padronizada de 4µm, por meio de um micrótomo rotativo Spencer 820 do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Universidade Estadual Paulista). Os cortes foram então montados em lâminas histológicas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), para contagem de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos; e Tricrômico de Masson (TM), para quantificação de colágeno.

As imagens histológicas dessas lâminas foram capturadas no Departamento de Engenharia dos Materiais, Aeronáutica e Automobilística (Laboratório de Transformação de Fase), pelo sistema de análise de imagem composto por uma câmera digital Motican 1300, embutida no microscópio óptico Leica® do modelo Leitz DMRX. As mesmas foram processadas pelo *software* Image Motic Image Advanced – versão 3.2 e aplicou-se as escalas nas imagens através do *software* Image Pró-Plus, com aumento de 500 vezes, foram obtidos 6 campos aleatórios de cada lâmina para posterior quantificação no *software* ImageJ.

4.3.5 - Eutanásia dos Animais

No 10º dia após a cirurgia, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (95 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg) e depois de realizada a coleta do segmento desejado, os animais, ainda anestesiados, realizou-se a eutanásia por injeção intracardíaca de KCl.

4.3.6 – Análise de Imagem

Delimitação e Quantificação da Área Total da Úlcera

Para padronizar sua escala, cada imagem foi calibrada pela ferramenta “*Analyze/Set Scale*”, onde permitiu ajustar a medida em *pixels/cm* por meio da régua contida na foto. Em seguida, selecionou-se o *plugin* “*polygon*” para a delimitação da borda da úlcera com o *mouse* (Figura 14), salvando em extensão ROI. Logo após o procedimento, o *software* calculou automaticamente a área em cm^2 pelo comando «CTRL+M».

Figura 14 – Segmentação da área ulcerada

Histomorfometria das Células e Vasos Sanguíneos

A partir das imagens histológicas coradas com HE obtidas pelo *software Motic Image Advanced*, realizou a contagem do número de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos do tecido lesionado a partir do *ImageJ*.

Ao abrir o campo histológico a ser analisado, selecionou-se o *plugin* “*Cell Counter*” para quantificar as células e vasos sanguíneos, selecionados pelo avaliador manualmente com auxílio do mouse. Esse *plugin* marca e quantifica diferentes áreas de interesse, sendo que o *software* automaticamente faz a contagem das marcações, fornecendo o total de cada tipo de célula. Dessa forma, foi estabelecido o tipo 1 para fibroblastos, o tipo 2 para células inflamatórias e o tipo 3 para vasos sanguíneos, como mostra a figura 15(A-C).

Figura 15 – Exemplo do protocolo para histomorfometria das lâminas coradas com HE (500x) utilizando o *Plugin* “*Cell Counter*” do *ImageJ*. Captação da imagem (A), respectivas contagens (B) e resultados (C)

Quantificação do Colágeno

As lâminas coradas com Tricrômico de Masson (TM) forneceram a área percentual do colágeno contido no campo analisado. Para isso, *plugin* “*Colour Deconvolution*” foi utilizado, como ilustra a Figura 16 (A). Em seguida apareceu as decomposições em 3 cores, descartou-se a de cor laranja e roxa, permanecendo assim a azul (Figura 16 – B). Selecionou o *plugin Image – Adjust – Threshold* (Figura 16 – C), surgiu a janela *Apply Lut*, foi selecionado os 3 itens e confirma (Figura 16 – D), em seguida aparece a janela *Threshold*, seleciona “*Red*” e aplica (Figura 16 – E). Por fim, na lateral da janela clique «CTRL+M», fornecendo assim os resultados (Figura 16 – F).

Figura 16 – Exemplo do procedimento para análise da quantidade de colágeno, através de lâminas coradas com Tricrômico de Masson utilizando o *Plugin “Colour Deconvolution”* do *ImageJ*. Aquisição da imagem (A), decomposição em três cores (B), Selecionou o *plugin Image – Adjust – Threshold* (C), surgiu a janela *Apply Lut* (D), aplica *Threshold* (E) e fornecimento dos resultados (F)

4.3.7 - Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e a análise estatística foi realizada através do programa MATLAB versão 7.8.0347 (R2009a) da *The MathWorks*, com o qual foi realizada a análise de normalidade e se optou, pelo fato dos dados serem normais, pelo teste ANOVA one way, com *post hoc* de Tukey, adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 - Análise Qualitativa

5.1.1 - Análise Clínico-Fotográfica

Os animais receberam hidratação duas vezes ao dia, o que permitiu o acompanhamento macroscópico do processo de cicatrização das feridas. Nesse período não foi realizado registro fotográfico, mas anotações foram feitas para descrever esse processo.

Inicialmente houve o extravasamento dos líquidos corpóreos (exudato e sangue) em todos os grupos, mas nos grupos com *patches* esses líquidos foram absorvidos pela matriz. Nos dois primeiros dias durante a aplicação da laserterapia os animais ficaram agitados e mudaram o comportamento a partir do 3º dia pós-operatório mostrando mais adaptados. Os animais com matrizes pareciam mais calmos.

Por volta do 4º dia pós-operatório foi observado no grupo controle (Ctrl), o início da formação de tecido de granulação. O grupo Laser também apresentou essa formação, porém durante a aplicação do *laser* a barreira plástica em contato com a lesão pode ter removido parte desse tecido. O que não aconteceu nos grupos com matrizes e apresentaram ressecamento (Figura 17), estavam mais escuras e pareciam aderidas ao tecido subjacente (semelhante a uma casca). Porém, o grupo Matriz foi exceção por apresentar bordas da lesão mais úmidas e moles e a matriz mais clara que os demais curativos.

Figura 17 – Foto representativa dos grupos com *patches* onde a seta mostra a formação da matriz em crosta

No 5º e 6º dia pós-operatório, o tecido de granulação apresentava mais remodelado no grupo Ctrl. Neste período também foi observado que alguns pontos de sutura começaram a se desprender das úlceras com *patches*. Além dos pontos caírem alguns curativos do grupo matriz se desmanchou ou desprenderam por completo. Em relação aos tamanhos das lesões

observou-se que os grupos Ctrl, ML, MQ e MQL apresentaram menor tamanho comparados com os grupos Matriz e Laser. Além de alguns curativos do grupo Matriz se desprenderem por completo.

O grupo Ctrl no 7º dia pós-operatório iniciou a formação da crosta como mostra a Figura 18, e é visível a redução progressiva da área das lesões, mostrando a migração das margens das úlceras no sentido centrípeto (reepitelização). Essa redução pode ser notada nas áreas dos grupos Ctrl, ML, MQ e MQL, mas nos grupos Matriz e Laser apresentam um pequeno retardo no processo cicatricial comparados com os demais grupos. Neste momento também foi observado que mais pontos se soltaram e alguns *patches* dos grupos com ou sem revestimento com quitosana se desprenderam e a úlcera continuou seu processo cicatricial.

Figura 18 – Foto representativa dos grupos sem matriz onde a seta mostra a formação da crosta na úlcera

Um aumento progressivo da redução das úlceras foi visível no 8º e 9º dia pós-operatório, onde independente dos grupos, a maioria das cascas se soltou, deixando exposto o leito da ferida macroscopicamente. No grupo Matriz o número de *patches* que se desprenderam foi maior em comparação aos demais grupos.

No dia do sacrifício, ou seja, 10º dia pós-operatório foram registradas imagens das úlceras (Figura 19) e foi calculada a área de cada animal (Anexo B), através do programa *ImageJ* versão 1.36. Onde posteriormente realizou-se o cálculo das médias das áreas e a análise estatística.

Figura 19 – No 10º dia pós-operatório imagens representativas dos grupos experimentais – Ctrl (controle); Laser (tratados com *laser*); Matriz (tratados com matriz de pericárdio); ML (tratados com matriz de pericárdio e *laser*); MQ (tratados com matriz de pericárdio revestida com quitosana) e MQL (tratados com matriz de pericárdio revestida com quitosana e *laser*)

5.1.2 - Análise Microscópica

Formação de Colágeno

Na análise histológica qualitativa o tecido cicatricial se apresenta com coloração mais clara, diferente do colágeno normal. O grupo Matriz apresentou uma formação colagênica menor e menos densa que os demais grupos. No grupo Laser essa formação também foi menor, porém organizado. O colágeno apresentou-se menos denso e desorganizado no grupo Ctrl. Além disso, os grupos ML, MQ e MQL apresentaram um aumento destacado na

formação de colágeno, no entanto no grupo MQL essa formação apresenta-se mais densa, organizada e disposta de forma paralela entre as fibras (Figura 20).

Figura 20 – No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (TM) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da formação do colágeno, onde as setas indicam a área azul, podendo ser mais densa, organizada e paralela [500x]

Células Inflamatórias

Os grupos Laser e Matriz apresentaram um aumento observável no número de células inflamatórias. Já os demais grupos esse infiltrado inflamatório foi menor (Figura 21).

Figura 21 – No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da distribuição das células inflamatórias, onde as setas indicam algumas dessas células [500x]

Vasos Sanguíneos

Os grupos Laser e ML apresentaram um incremento no número de vasos sanguíneos e esses vasos se mostraram maiores nas suas dimensões individuais. O grupo MQL apresentou menor quantidade de vasos (Figura 22).

Figura 22 – No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações do calibre dos vasos sanguíneos, onde as setas indicam alguns desses vasos [500x]

Fibroblastos

O número de fibroblastos foi menor no grupo Laser comparado aos demais grupos. Os grupos MQ e MQL apresentaram números maiores de fibroblastos observáveis (Figura 23).

Figura 23 – No 10º dia pós-operatório imagens histológicas (HE) representativas dos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL, para comparações da forma dos fibroblastos, onde as setas indicam alguns dessas células [500x]

5.2 – Análise Quantitativa

Com os dados obtidos por observação e mensuração dos grupos experimentais e o controle, foram avaliados os seguintes parâmetros: as áreas de lesão da pele, quantidade de colágeno, número de células inflamatórias, número de vasos sanguíneos e número de fibroblastos. Inicialmente foi feito um estudo exploratório (estatística descritiva) dos resultados a fim de analisar o comportamento dessas variáveis (ANEXO D - H). Para tanto, o teste aplicado foi o ANOVA estabelecido com 95% de potência $p < 0,05$ para verificar possíveis diferenças significantes entre os grupos. Após isso, caso houvesse diferença entre os

grupos, foi aplicado um *post hoc* de Tukey. Para isso foi utilizado a plataforma MATLAB[®] versão 7.8.0347 (R2009a) da *The MathWorks*.

5.2.1 - Análise Macroscópica

As médias das áreas foram analisadas e a representação de sua amostragem está ilustrada na Figura 24. No 10º dia pós-operatório foram registradas as áreas das úlceras e foram calculadas as médias das áreas dos grupos, onde o grupo Laser apresentou uma média de $0,48\text{cm}^2$, o grupo Matriz= $0,46\text{cm}^2$, Ctrl= $0,28\text{cm}^2$, ML= $0,23\text{cm}^2$, MQ= $0,22\text{cm}^2$ e MQL= $0,19\text{cm}^2$.

Figura 24 – As médias das áreas das lesões dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle

O grupo Ctrl apresentou diferença estatística ($p<0,01$) quando comparado aos grupos Laser e Matriz, apresentando cicatrização mais rápida e quando comparado com o grupo MQL obteve processo cicatricial mais lento. Quando comparado aos grupos ML e MQ não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$).

Estatisticamente, o grupo Laser não demonstrou diferença quando comparado com o grupo Matriz, mas ao comparar com os grupos ML, MQ e MQL, apresentou menor reparo tecidual ($p<0,01$).

Os tratados com *patches* (ML, MQ e MQL) apresentaram melhores resultados em relação à cicatrização cutânea não mostrando diferença estatística entre os mesmos ($p>0,05$),

com exceção do grupo Matriz, onde apresentou um atraso no processo cicatricial, com diferença estatística ($p < 0,01$) ao comparar com o grupo Ctrl.

5.2.2 - Análise Microscópica

Formação de Colágeno

As médias dos grupos foram analisadas e a representação de sua amostragem está ilustrada na Figura 25. Onde demonstra que o grupo Ctrl apresentou uma quantidade percentual de colágeno em média de 58,84, o grupo Laser=54,51, Matriz=51,75, ML=68,77, MQ=69,50 e MQL=71,72.

Figura 25 – As médias da quantidade de formação de colágeno dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle

Com relação à variável formação de colágeno ao comparar os grupos ML, MQ e MQL com os demais grupos apresentaram diferença estatística ($p = 0,0001$), por apresentar maiores médias de quantidade de colágeno. Porém, ao comparar ML aos grupos MQ ($p = 0,739$) e MQL ($p = 0,172$) não apresentaram diferença estatística. O mesmo ocorre com o grupo Laser quando comparado com o grupo Matriz ($p = 0,068$).

O grupo Ctrl apresentou melhores resultados quando comparados aos grupos Laser ($p = 0,023$) e Matriz ($p = 0,002$).

Células Inflamatórias

Na Figura 26 está ilustrada a representação da amostragem das médias dos grupos, a qual demonstra que o grupo Ctrl apresentou um número de células inflamatórias com média de 101,85, o grupo Laser=126,31, Matriz=132,40, ML=97,67, MQ=95,27 e MQL=94,15.

Figura 26 – As médias dos números de células Inflamatórias dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle e (+) out layer

Ao comparar os grupos ML, MQ e MQL, com relação a células inflamatórias, com os grupos Laser ($p < 0,002$) e Matriz ($p = 0,0001$) apresentaram diferença estatística, apresentando menor número de células inflamatórias. Porém, quando comparados entre si ($p > 0,05$) e também ao se comparar ao grupo Ctrl ($p = 0,267$), não apresentaram diferenças estatísticas.

O Grupo Ctrl apresentou melhores resultados quando comparados aos grupos Laser ($p = 0,018$) e Matriz ($p = 0,0001$). E quando comparados os grupos Laser e Matriz não apresentaram diferença estatística ($p = 0,430$).

Vasos Sanguíneos

Com relação á quantidade de vasos sanguíneos a Figura 27, ilustra a representação da amostragem das médias dos grupos, a qual demonstra que o grupo Ctrl apresentou uma média de 5,37, o grupo Laser=6,83, Matriz=4,48, ML=7,46, MQ=5,42 e MQL=3,98.

Figura 27 – As médias do número de vasos sanguíneos dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle e (+) *out layer*

Estatisticamente o grupo Ctrl não apresentou diferença quando comparado aos grupos Laser ($p=0,074$), Matriz ($p=0,071$) e MQ ($p=0,935$). Porém quando comparado com o grupo ML ($p=0,004$), apresentou diferença por conter menor número de vasos sanguíneos, e o oposto ocorre quando comparado com o grupo MQL ($p=0,018$).

O grupo Laser não apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos ML ($p=0,433$) e MQ ($p=0,063$), mas quando comparado aos grupos Matriz ($p=0,003$) e MQL ($p=0,001$) houve a diferença estatística, onde no grupo Laser o incremento de vasos foi maior.

Ao comparar o grupo Matriz com o grupo ML ($p=0,0001$) e o grupo MQ ($p=0,022$) estatisticamente mostrou diferença, pois a média do grupo Matriz foi menor. No entanto ao comparar com o grupo MQL não apresentou diferença estatística ($p=0,214$).

A diferença estatística foi observada quando comparado o grupo ML aos grupos MQ ($p=0,002$) e MQL ($p=0,0001$), onde se observa a presença de menor número de vasos.

O grupo MQ apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo MQL, por apresentar maior número de vasos sanguíneos ($p=0,006$).

Fibroblastos

A representação das amostragens das médias dos grupos, com relação à quantidade de fibroblastos está ilustrada na Figura 28, a qual demonstra que o grupo Ctrl apresentou uma

média de 78,63, o grupo Laser=55,83, Matriz=71,31, ML=85,40, MQ=105,06 e MQL=108,58.

Figura 28 – As médias do número de fibroblastos dos grupos experimentais e seu desvio padrão – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL. Os grupos assinalados com (*) tiveram diferença estatística com o controle

Ao comparar o grupo Laser com os demais grupos apresentou diferença estatística, pois apresentou menor média de número de fibroblastos, ou seja, com o grupo matriz ($p=0,020$) e com os grupos Ctrl ($p=0,004$), ML, MQ e MQL ($p=0,0001$).

O grupo Matriz apresentou a segunda menor média e quando comparado com o grupo Ctrl, não apresentou diferença estatística ($p=0,277$). Quando comparado com os grupos ML ($p=0,035$), MQ e MQL ($p=0,0001$) apresentaram diferença estatística.

Estatisticamente, o grupo ML apresentou diferença quando comparados aos grupos MQ ($p=0,002$) e MQL ($p=0,001$), apresentando menor média. Além disso, o ML não apresentou diferença quando comparado ao Ctrl ($p=0,332$).

O grupo Ctrl quando comparado aos grupos MQ e MQL ($p=0,0001$), apresentaram diferença estatística, ou seja, o grupo Ctrl apresentou menor média de número de fibroblastos. Os grupos MQ e MQL não apresentaram diferença ($p=0,386$).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi elaborado a fim de avaliar a ação fotobiomoduladora do *laser*, com o auxílio do curativo de pericárdio porcino revestido com quitosana, no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos e verificar se a matriz acelular é eficaz como substituto temporário de pele no tratamento de lesões extensas, permitindo a reepitelização tendo em vista a escassa abordagem pela literatura a respeito dessa associação de tratamentos no leito da úlcera.

6.1 – Metodologia

A utilização de ratos neste estudo foi devido à possibilidade de um maior número de amostragem por grupo, além de apresentarem resultados em curto período resultante do acelerado metabolismo. A sexualidade do animal foi definida por ratos machos devido à variabilidade no ciclo hormonal das fêmeas.

Como nos estudos de Cross et al. (1995) a opção de contenção manual durante as estimulações foi baseada no fato de não expor repetidamente o animal a procedimentos anestésicos, o que poderia ser deletéria à sua saúde, consome tempo, produz estresse, e pode causar danos a ferida durante a indução da anestesia.

Kashyap et al. (1995) consideram o dorso do animal o melhor local para o sítio de incisão, pois evita a irritação por contato e autocanibalismo. Por esse motivo foi escolhido o dorso do animal.

O *patch* escolhido foi a matriz dérmica acelular de pericárdio porcino, pois apresenta baixa antigenicidade, atoxicidade e biocompatibilidade (HATTORI et al., 2006). Entretanto, esses *patches* têm uma biodegradação rápida, por isso adicionou-se quitosana para diminuir a degradação, além de apresentar ação antimicrobiana e redutora do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000).

Assim como Guirro e Guirro (2004) que verificaram a transmissividade da laserterapia em diferentes curativos oclusivos, onde a fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica microporosa permitiu a passagem de 36% da radiação. O mesmo foi feito com a matriz junto com a barreira plástica, onde observou que durante os três primeiros dias a transmissividade foi de 80% e a partir do momento que a matriz se transformou em crosta passa a ser de 20%.

Optou-se em realizar apenas uma úlcera no dorso de cada animal, para obter uma análise fidedigna das ações da radiação *laser* no processo de cicatrização tecidual, pois a laserterapia apresenta efeito sistêmico que pode provocar uma falha na observação dos efeitos

significantes ao comparar o tecido tratado com laser com o lado oposto do mesmo animal (JAYASREE et al., 2001).

A laserterapia foi aplicada nos vértices da lesão, pois nas bordas apresenta maior quantidade de células inflamatórias, o que repercutiria numa maior produção/liberação de fatores de crescimento e citocina importante para a angiogenese e consequentemente para o processo cicatricial.

Na prática clínica, o ato de retirar sucessivamente o curativo da ferida cirúrgica para esta ser submetida a tratamentos, pode remover células envolvidas no processo cicatricial, estimular a dor, além do alto custo dos curativos. Portanto desencadeou o interesse em analisar se o *patch* interfere na radiação *laser* durante o ato terapêutico, para conquistar um efetivo processo de reparação tecidual.

6.2 – Dados Qualitativos

As matrizes de pericárdio porcino revestida (MQ/ MQL) ou não (Matriz/ ML) com quitosana demonstraram ser de manuseio fácil, com textura semelhante a papel de seda. Mostraram ser resistente à tensão dos pontos e não rasgaram quando perfuradas pela agulha escolhida para o experimento, semelhante à membrana de serosa porcina que foi utilizada no trabalho da Girardi (2005).

A hidratação diária da membrana e úlcera foi realizada com a mistura de glicerina com solução salina a 25%, pois segundo Busnardo et al. (2009) a glicerina pode atuar contra fungos e bactérias, mas a glicerina é muito espessa. Por esse motivo misturou a solução salina, na proporção de um para três tornando a glicerina mais aquosa (glicerina-1/ solução salina-3). Portanto com o ato de borrifar a mistura de glicerina e solução salina, pode ter contribuído para a ausência de sinais de infecção e prevenindo a desidratação precoce.

As matrizes ressecaram mesmo sendo hidratadas diariamente. Sua rápida retração pode ter auxiliado mecanicamente no processo cicatricial por aproximar as bordas das úlceras.

Com a aplicação das matrizes as úlceras não apresentaram crostas, a matriz se comportou como uma crosta, isso foi positivo, pois, sabe-se que as feridas ocluídas cicatrizam mais rápidas porque a formação crostosa que ocorre sobre a área cruenta é prevenida ou minimizada, com consequente redução do processo inflamatório e formação de cicatriz menos aparente como explica Bennett (1988).

Os curativos do grupo Matriz começaram a desmanchar e cair antes dos outros grupos, isso se remete ao fato da sua rápida biodegradação confirmando as idéias de Tangsadthakun

et al. (2006). Para reduzir a taxa de degradação utilizam-se polímeros como a quitosana, por isso os grupos com a aplicação de curativo revestido com quitosana não desmanchou e demoraram a se desprender (RODRIGUES et al., 2010). Além da quitosana, a laserterapia também contribuiu para a permanência da matriz, por apresentar efeito antibacteriano (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998) e através de estudo *in vitro*, Libanore (2008) observou a inibição do crescimento bacteriano.

Os animais dos grupos com matrizes durante as aplicações da fototerapia pareciam mais calmos, além de não remover tecidos de granulação ao colocar e retirar a barreira plástica (filme de policloreto de vinila), não podendo dizer o mesmo aos grupos sem a aplicação da matriz, pois os animais desses grupos pareciam mais agitados e também foi observado que ao remover a barreira plástica, a mesma ficou suja de sangue.

No grupo Ctrl iniciou a formação da crosta antes dos outros grupos e é visível a redução progressiva da área das lesões, mostrando a migração das margens das úlceras no sentido centrípeto (reepitelização) esse processo corrobora com Witte e Barbul (2007). Essa redução foi notada também nas áreas dos grupos ML, MQ e MQL.

O estudo histopatológico foi realizado com as amostras dos seis grupos experimentais, para avaliar as modificações teciduais relacionadas à aplicação do curativo biológico revestido com quitosana ou não, à aplicação do laser nos vértices da lesão e ao grupo controle. As biópsias foram realizadas no final do tratamento (10º dia pós-operatório).

Histologicamente puderam ser observadas algumas variações nos diferentes grupos e ao observar a formação colagênica, a estimulação da radiação laser tem grande influência sobre as fibras colágenas, a qual mostra maior tendência à organização e orientação paralela em comparação ao controle. Confirmando a pesquisa de Tartarunas et al. (1998) ao comparar as alterações histológicas em lesões cutâneas tratadas ou não com laser AsGa. Essa tendência da organização também foi observada por Pugliese et al. (2003) ao estudar a influência do laser de baixa intensidade sobre fibras colágenas e elásticas, e obteve como resultado um padrão organizado mais evidente e com fibras mais unidas no grupo tratado em comparação ao grupo não tratado.

Os grupos tratados com matriz associado ou não com laserterapia também mostraram essa tendência à organização das fibras de colágeno, avigorando com o trabalho de Girardi (2005) que aplicou matriz acelular (curativo biológico) e obteve como resultado a distribuição uniforme entre fibras no 9º dia pós-operatório. Apesar dessa tendência à organização, os grupos Laser e Matriz apresentaram menor quantidade de colágeno, onde o laser com suas altas doses na irradiação das úlceras inibindo a síntese de colágeno (HAWKINS;

ABRAHAMSE, 2006), e a ausência da quitosana na matriz que poderia promover a síntese de colágeno (LIE et al., 2007). Em contrapartida no grupo Ctrl a formação colagênica apresentou-se menos densa e desorganizada, que corrobora com a pesquisa de Cardoso (2003).

Analisando a variável células inflamatórias, nos grupos Laser e Matriz foi observado grande quantidade de infiltrado inflamatório, por conta do retardo cicatricial. No entanto nos demais grupos o infiltrado inflamatório foi mais discreto, porém, apesar de não apresentar diferença estatística significativa, o grupo MQL, histologicamente, apresentou menor quantidade de células inflamatórias quando comparado ao grupo Ctrl, diante disso, a quitosana possui a função de esterilização (CHO et al., 1999). Em todos os grupos, o infiltrado inflamatório é misto, com predomínio de macrófagos e linfócitos. Esses achados confirmam com os resultados de Girardi (2005), no qual se encontra infiltrados inflamatórios em menor quantidade nos grupos tratados com curativo biológico.

Quanto à variável vasos sanguíneos, os grupos Laser e ML apresentaram grande quantidade de vasos neoformados de maior calibre. Esses dados reforçam os estudos de Cardoso (2003), Corazza (2005), Cury (2009), que mostraram a eficiência da laserterapia para a angiogenese. A aplicação da matriz com ou sem quitosana, também contribuiu para essa formação, pois segundo Lie et al. (2007) a matriz composta de colágeno e quitosana pode acelerar a vascularização. O grupo MQL apresentou menor calibre e quantidade de vasos, isso se deve pelo processo acelerado da cicatrização, dando início a fase de remodelamento.

Com relação à variável fibroblasto, o grupo Laser apresentou discreta quantidade de fibroblasto, assim como o grupo controle, onde as células aparecem desorientadas. Em contrapartida nos grupos MQ e MQL notam-se tecido de granulação formado por fibroblastos maduros e menos volumosos, com formato alongado (fusiforme), unidirecionais e paralelos entre si. Cardoso (2003) em seu trabalho encontrou boa proliferação de fibroblasto na mucosa, após associar curativo com laserterapia, o que corrobora com o presente estudo, quando apresentado o grupo MQL, onde a associação da matriz de colágeno revestida com quitosana e a laserterapia é capaz de acelerar a proliferação de fibroblastos (CHO et al., 1999).

6.3 – Dados Quantitativos

As eutanásias ocorreram no 10º dia pós-operatório, pois se prolongasse a pesquisa os processos cicatriciais estariam completos, não nos permitindo os cálculos das áreas das úlceras. Portanto, as análises macroscópicas foram realizadas em todos os grupos através do

programa *ImageJ*, mostrando que as médias dos grupos Matriz e Laser foram significantes ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo Ctrl, da mesma forma que Leite (2009).

Grupo Laser apresentou maior média das áreas das úlceras, mantidas consequentemente um atraso na reepitelização. Possivelmente isso ocorreu porque a dose utilizada foi excessiva influenciando nas funções celulares com a inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas corroborando com Cury et al. (2009) que sugere que as doses de $30\text{j}/\text{cm}^2$ e $40\text{j}/\text{cm}^2$ utilizadas em seus estudos, foram maiores do que a dose ideal necessária para produzir um aumento na viabilidade do retalho, pois Bossini et al. (2007) afirmou em seu trabalho que a dose de $24\text{j}/\text{cm}^2$ foi eficiente para aumentar a viabilidade do retalho.

Já faz algum tempo que essa teoria sobre o efeito inibitório vem sendo estudada por vários autores, como Kitchen e Bazin (1996), Kloth (1997) e Tiphlova e Karu (1987). Karu (1987) em seus estudos observou que a inibição, em alguns processos biológicos, acontece pela fotodestruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória. O efeito inibitório pode ocorrer também por aplicações repetidas levando a efeitos acumulativos (MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A., 1985). Portanto, segundo Schaffer et al. (1997) a radiação *laser* de baixa intensidade resulta em modulação das atividades celulares, depois da aplicação de $4\text{j}/\text{cm}^2$, em contrapartida quando aplicou a fluência de $20\text{j}/\text{cm}^2$ determinou uma ligeira diminuição dessa modulação.

O grupo Matriz não apresentou bons resultados no processo de reparação cutânea, isso pode ter ocorrido pela falta das propriedades da quitosana, pois os grupos com este revestimento apresentaram maior biocompatibilidade com consequente aceleração na cicatrização. Porém quando aplicada a fototerapia, no caso o grupo ML, a matriz mostrou-se eficiente permitindo que a radiação chegasse à lesão com a energia ideal, por esse motivo as propriedades do *laser* proporcionaram uma aceleração no reparo tecidual.

O grupo MQL foi o que obteve melhor resultado quando comparado com o Ctrl, onde mostrou uma reepitelização mais rápida. Possivelmente a associação do colágeno da matriz e o revestimento da quitosana, proporcionaram propriedades como baixa antigenicidade, atoxicidade e biocompatibilidade (HATTORI et al., 2006), e com a adição de quitosana diminuiu a taxa de degradação da matriz, pois a collagenase degrada mais rápido o colágeno do que quitosana *in vivo*, além, de melhorar as propriedades mecânicas (RODRIGUES et al., 2010). Quando aplicada a fototerapia com a energia ideal, houve a aceleração do processo cicatricial como observado por Medrado et al. (2003). Isso porque a radiação *laser* aumenta o número de células do estrato basal, denominada germinativa, e do estrato espinhoso,

acelerando o processo de reepitelização (MESTER et al., 1971). Além de induzir respostas nos tecidos, como diminuição do processo inflamatório, redução de edema, aumento da fagocitose e da síntese de colágeno (BAXTER, 1994). E por fim, há indicações que o laser estimule a transformação precoce de fibroblastos em miofibroblastos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006), levando assim o fechamento da lesão em um menor tempo.

Em análise histomorfométrica a porcentagem de colágeno depositada até o 10º dia pós-operatório, os grupos ML, MQ e MQL, estatisticamente, foram os que apresentaram maior quantidade de colágeno. Tais resultados fortalecem com o estudo de Carvalho et al. (2003), no qual demonstraram que o efeito mais importante do laser de baixa intensidade, sobre o processo de cicatrização das lesões, foi o aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos. Além disso, a matriz proporcionou benefícios do meio úmido, ou seja, prevenção de desidratação do tecido mantendo as células viáveis e permite que elas liberem fatores de crescimento estimulando sua proliferação (FIELD; KERSTEIN, 1994). E o revestimento com quitosana para a redução do período de degradação da matriz (RODRIGUES et al., 2010), e promover a síntese de colágeno (LIE et al., 2007). Por esse motivo o grupo MQL que soma todas essas contribuições foi o que apresentou melhor resultado com relação ao grupo Ctrl.

Em contrapartida o grupo Laser apresentou retardo na formação colagênica, quiçá pelo efeito de inibição já descrita anteriormente.

O mesmo ocorre com o grupo Matriz, contudo esse retardo na formação de colágeno deve-se possivelmente pela rápida degradação, pois os *patches* se desmancharam, provocando o aumento de células inflamatórias, retardando o processo cicatricial, diminuindo assim a formação de colágeno.

Com avaliação da variável células inflamatórias, os grupos Ctrl, ML, MQ e MQL não apresentaram diferenças estatísticas, porém os grupos Laser e matriz apresentaram um aumento significativo do número de células inflamatórias. Corazza (2005) observou que animais irradiados com laser na dosagem de 5 J/cm² apresentaram redução das células inflamatórias, e sugere que a fotomodulação corresponde a um aumento inicial do número de células inflamatórias, principalmente os macrófagos e linfócitos, removendo rapidamente o excesso de detritos e, posteriormente, a redução do número destas células. Para o grupo Laser do presente estudo não se aplica essa teoria, pois houve o aumento de células, porém não houve a redução das mesmas, possivelmente devido às lesões terem ficado expostas a altas doses de fototerapia. Porém os grupos ML e MQL apresentaram essa redução, provavelmente

por permitirem a passagem da dose ideal para o processo cicatricial o que nos fortalece com o estudo de Corazza (2005).

O aumento do número de células inflamatórias presente no grupo matriz, provavelmente está relacionado à degradação da matriz, ou pela carga negativa, pois tecidos desvitalizados podem ser considerados corpos estranhos tornando-se um fator irritante para os tecidos (LIE et al., 2007; LODOVICI, 1994), porém, apesar de menor quantidade, os demais grupos apresentaram células inflamatórias, reforçando as informações de Ramos (2004), onde o seu grupo com implante de matriz dérmica apresentou células inflamatórias.

Em relação ao número de vasos sanguíneos, o laser estimulou significativamente a neovascularização, o que reforça com estudos de Mester et al. (1985) onde demonstraram que o desenvolvimento dos vasos sanguíneos foi influenciado pelo laser de baixa intensidade. Cury et al. (2009), baseados no princípio da radiação laser possuir a capacidade de promover a angiogênese e aumento do fluxo sanguíneo, investigaram este recurso na viabilidade de retalhos cutâneos. Seus achados demonstraram que a terapia aumentou o número de vasos. Portanto, os grupos Laser e ML foram os que apresentaram maior quantidade de vasos, de acordo com Ramos (2004) que observou em seu trabalho que lesões tratadas com Matriz apresentaram maior número de vasos sanguíneos que o grupo controle. Isso se deve pelo fato de que uma das funções da matriz de colágeno com ou sem revestimento da quitosana é acelerar a vascularização (LIE et al., 2007).

Em contrapartida o grupo MQL não apresentou um aumento de vasos sanguíneos por estar em um estágio avançado no processo de cicatrização, corroborando com Jorge (2009), que afirma que o tecido de granulação de altamente vascularizado torna-se uma massa fibrótica avascular e acelular.

Considerando a variável fibroblasto, o grupo Laser em relação aos demais grupos, estatisticamente, foi o que apresentou menor número de fibroblastos. Vários estudos indicam que a luz laser promove aumento da proliferação fibroblástica entre eles Rocha Junior et al. (2006) que analisou o efeito das diferentes doses do laser HeNe sobre cultura de fibroblasto humano; e Hawkins e Abrahamse (2006) verificaram que as menores doses utilizadas (2,5 e 5 J/cm²) estimularam a proliferação e migração, enquanto as altas doses (10 J/cm²) inibiram as células. Doses altas também provocaram efeito reduzido ou contrário nos trabalhos de Simunovic et al. (2000) assemelhando com o presente estudo, onde ao padronizar a dosimetria para as aplicações em todos os grupos que foi recrutado a laserterapia, o grupo que não apresentou matriz foi submetido por doses mais altas do que os demais grupos. No entanto, os grupos que apresentaram um rápido processo de cicatrização, ou seja, os grupos MQ e MQL

apresentaram as maiores médias do número de fibroblastos. Isso se deve ao revestimento de quitosana onde a matriz tornou-se resistente a biodegradação (BOUCARD et al., 2007), proliferação de fibroblastos (CHO et al., 1999), além de bloquear a passagem de uma parte da radiação, permitindo assim uma dose ideal, sem ter que remover os curativos biológicos.

Assim, considerando as diferenças encontradas através das análises macroscopicamente e microscópicas, entre os grupos experimentais, torna-se evidente a ação positiva das terapias associadas, onde o grupo MQL apresentou respostas melhores aos tratamentos.

6.4 – Perspectivas

- ✓ Desenvolver uma matriz de pericárdio porcino com revestimento de quitosana, com características para torná-la substituto de pele.
- ✓ Realizar culturas de células neste *patch*, utilizando como carreador de células.
- ✓ Desenvolver protocolos de lesões cutâneas e verificar se a laserterapia pode ser eficiente antes e/ou depois da aplicação da matriz

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O melhor curativo para cicatrização de lesão cutânea foi com o revestimento da quitosana, porém a matriz sem revestimento da quitosana associada à laserterapia também apresentou bons resultados.
- ✓ A associação da laserterapia sob curativo de colágeno revestido com quitosana foi o que apresentou melhor processo de cicatrização no ponto de vista biométrico e histológico.
- ✓ Nos três primeiros dias a transmissividade foi de 80% e a partir do momento que a matriz se tornou em crosta, passa a ser 20%.
- ✓ Os grupos Laser e Matriz foram os que apresentaram elevado número de células inflamatórias.
- ✓ A neovascularização foi maior em quantidade e calibre nos grupos Laser e ML.
- ✓ A proliferação de fibroblastos apresentou-se maior nos grupos ML, MQ e MQL.
- ✓ No grupo MQL a formação colagênica apresentou-se mais densa, organizada e paralela entre si.

7 CONCLUSÃO

Dentro das condições e parâmetros estudados na presente pesquisa podemos concluir que o *patch* demonstrou ser uma boa opção para o reparo tecidual por ser de fácil obtenção, armazenamento e manuseio, além de ter baixo custo. Atende as principais exigências para ser um curativo biológico oclusivo estimulando o processo de granulação, contração e epitelização, além de formar uma barreira física contra a invasão bacteriana. O revestimento da quitosana proporcionou principalmente redução do período cicatricial. Portanto, as características da matriz somadas com as da quitosana permitiram a formação de um *patch* ideal para acelerar o reparo tecidual.

O laser de AlGaInP (660nm) acelerou o processo cicatricial das úlceras cutâneas com os *patches*, obtendo melhor resposta com a matriz revestida com quitosana no ponto de vista biométrico e histológico. Os parâmetros utilizados para aplicação direta na úlcera foram elevados provocando inibição na cicatrização das úlceras.

Portanto o grupo MQL apresentou melhores resultados no tratamento das lesões cutâneas, a partir dos resultados obtidos macroscopicamente e microscopicamente.

REFERÊNCIAS

AGAIBY, A. D.; GHALI, L.R.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 357-363, 2000.

BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, K. M.; RENNO, A. C.; BENZE, B.; ZUANON, J. A.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURY, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-41, jan./mar., 2005.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. **Wound Care Essentials**. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

BAXTER, G. D.; BELL, A. J.; ALLEN, J. M.; RAVEY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Churchill Livingstone, 1997.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-11, 2003.

BENNETT, R. G. Dressings and miscellaneous surgical materials. In: _____. **Fundamentals of cutaneous surgery**. St Louis, Mosby, p. 310-351, 1988.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines and glutamine carboxyamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074-1079, 2001.

BORTOT, B. A. **Análise do laser AlGaInP no processo de reparação tecidual de lesões cutâneas**. Dissertação (mestrado em Fisioterapia) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – Faculdade de Ciências da saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2005.

BOUCARD, N.; VITON, C.; AGAY, D.; MARI, E.; ROGER, T.; CHANCERELLE, Y.; DOMARD, A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. **Biomaterials**, v. 28, p. 3478–3488, 2007.

BOYCE, S. T.; KAGAN, R. J.; MEYER, N. A.; YAKUBOFF, K. P.; WARDEN, G. D. The 1999 clinical research award cultured skin substitutes combined with integra artificial skin to replace native skin autograft and allograft for the closure of excised full – thickness burns. **Journal of Burn Care and Rehabilitation**, v. 20, n. 6, p. 453-461, 1999.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 1e-S – 32e-S, 2006.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG H. L. Collagen membranes: a review. **Journal Periodontol**, v. 72, n. 2, p. 215-229, 2001.

BUSNARDO, C. A.; FREITAS, P. M. C. ; EURIDES, D.; RONCETTI, G. R.; NUNES, L. C.; BELLETI, M. E. Peritônio de bovino como bandagem em queimaduras cutâneas Experimentais em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 823-828, jul./set. 2009.

CARDOSO, C. A. C. **Análise histomorfométrico do reparo tecidual após laserterapia e aplicação de adesivo**. Dissertação (mestrado em Engenharia Biomédica) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; SIQUEIRA, J. F. R.; FERREIRA, J. V. L.; SILVA, I. S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, p. 253-258, 2003.

CHO, Y. W.; CHO, Y. N.; CHUNG, S. H.; YOO, G.; KO, S. W. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. **Biomateriais**, v. 20, p. 2139-2145, 1999.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre Laser e LED de baixa intensidade na angiogenese de feridas cutâneas em ratos**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L; SCHOEN, F. J. Inflamação e Reparação. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 45-83, 1996.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: _____. **Robbins – Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 79-100, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. *BR n. PI 9805480-5A*. 12 set., 2000.

CROSS, S. E.; NAYLOR, I. L.; COLEMAN, R. A.; TEO, T. C. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, p.189-197, 1995.

CURY, V.; BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; CRUSCA, J. S.; RENNO, A. C.; PARIZOTTO, N. A. The effects of 660nm and 780nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 5, p. 721-724, 2009.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 283-289, jan. 2004.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, p. 433-437, 1996.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-525, 2007.

FENG, X.; SHEN, R.; TAN, J.; CHEN, X.; PAN, Y.; RUAN, S.; ZHANG, F.; LIN, Z.; ZENG, Y.; WANG, X.; LIN, Y.; WU, Q. The study of inhibiting systematic inflammatory response syndrome by applying xenogenic (porcine) acellular dermal matrix on second-degree burns. **Burns**, v. 33, p. 477- 479, 2007.

FIELD, C. K.; KERSTEIN, M. D.; Overview of wound healing in moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1, p. 2-6, 1994.

FUJIMAKI, Y.; SHIMOYAMA, T.; LIU, Q.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **Journal of Clinical Laser Medicine Surgery**, v. 21, n. 3, p. 165-170, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GASQUE, K. C. S.; OLIVEIRA, R. C.; CEOLIN, D.; CESTARI, T. M.; TAGA, R.; TAGA, E. M.; CORRÊA, A.; PAIVA, K. B.; TAKYIA, C. M.; GRANJEIRO, J. M. Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. *Cienc Odontol Bras*, v. 11, n. 1, p. 58-66, jan./mar., 2008.

GE, L.; ZHENG, S.; WEI, H. Comparison of histological structure and biocompatibility between human acellular dermal matrix (ADM) and porcine ADM. **Burns**, 2008.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 513-521, Apr., 2001.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de Matrizes de Colágeno Utilizadas no Tratamento de Feridas Planas Induzidas em Pele de Rato**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, p. 5-13, 1998.

GRAY, F. R. H. O Tegumento. In:_____. **Anatomia**. 29. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988, cap. 14, p. 891-907.

GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 212-218, 1998.

GUIRRO, R. R. J; GUIRRO, E. C. O. Analysis of the transmissivity of low power laser radiation in different occlusive dressings. In: **5th Congress of the World Association for Laser Therapy**. Guarujá – SP, Brasil, v. 25, p. 19, nov., 2004.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314-321, 2008.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Science, medicine, and the future: healing chronic wounds. **BMJ**, v. 324, p. 160-163, 2002.

HATTORI, K.; JORAKU, A.; MIYAGAWA, T.; KAWAI, K.; OYASU, R.; AKAZA, H. Bladder reconstruction using a collagen patch prefabricated within the omentum. **International Journal of Urology**, v. 13, p. 529-537, 2006.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation and membrane integrity of wounded human skin fibroblast following helium-neon laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, n. 38, p. 74-83, 2006.

HOYAMA, E.; SCHELLINI, S. A.; PELLIZON C. H.; MARQUES M. E. A.; PADOVANI C. R.; ROSSA R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 369-374, 2005.

JAKSIC, T.; BURKE, J. F. The use of 'artificial skin' for burns. **Annual Review of Medicine**, v. 38, p. 107-117, 1987.

JAYASREE, R. S.; GUPTA, A. K.; RATHINAM, K.; MOHANAN, P. V.; MOHANTY, M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 15, p. 176-186, 2001.

JORGE, A. E. S. **Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARU, T. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers and the Life Science**, v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

_____. Photobiological of low powers laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

_____. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of Effects of Low Power Light on Biological Systems**, v. 2630, p. 2-9, 1995.

_____. **The science of low-power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

_____. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photoshchemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, p. 1-17, 1999.

_____. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I.; LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 1-7, 2000.

_____. Low power laser therapy. In: **Biomedical Photonics Handbook**, cap. 48, p. 1-25, 2003.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photoshchemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 219-233, 1995.

KARUKONDA, R. K.; FLYNN, T. C.; BOH, E. E.; MILLIKAN, L. E.; RUSSO, G. G.; MCBURNEY, I. The effects of drugs on wound healing: part 1. **International Journal Dermatology**, v. 39, n. 4, p. 250-257, Apr., 2000.

KASHYAP, A.; BEEZHOLD, D.; WISEMAN, J.; BECK, W. C. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. **The American Surgeon**, v. 61, p. 486- 491, 1995.

KIERSZENBAUM, L. A. **Histologia e Biologia Básica: uma introdução à patologia**. 1 ed. Elsevier, 2004.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M. H.; SHANKAR, L. R.; KHANNA, L.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 355-364, 2001.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A review of low level laser therapy. **Physioterapy**, v. 77, n. 3, p. 161-168, 1991.

KITCHEN, S. S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, p. 191-210, 1996.

KLOTH, L. **Wound Healing: alternatives in management**. USA: Churchill Livingstone, p. 347-364, 1997.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S-I.; SHIMODA, K. Squid Chitin as a potencial alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science: Part A Polymer Chemistry**, v. 31, p. 485-491, 1993.

LACERDA, T. M., MARTINS, V. C. A., PLEPIS, A. M. G. Matriz de colágeno tipo 1 associada à quitosana. In: IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. **Anais do IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. Caxambu, 2006.

LEE, W. K.; PARK, K. D.; HAN, D. K.; SUH, H.; PARK, J. C.; KIM, Y. H. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. **Biomaterials**, v. 21, n. 22, p. 2323-2330, nov., 2000.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LEITE, S. N.; ANDRADE, T. A. M.; MINATEL, D. G.; FRADE, M. A. C. Fototerapia como estímulo a cicatrização de úlceras dorsais em ratos nutridos e desnutridos. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. **Anais dos 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**. Salvador: ISBN: 978-85-60064-13-7, 2008.

LEITE, S. N. **Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras cutâneas em ratos nutridos e desnutridos**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LI, J.; CHEN, J.; KISNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LIBANORE, D. Z. **Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

LIE, M.; YANCHAO, S.; YIXIN, C. HAIGUANG, Z. CHANGYOU, G.; CHUNMAO, H. In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/ silicone membrane bilayer dermal equivalent. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 2185–2191, 2007.

LIVESEY S. A.; HERNDON, D. N.; HOLLYOAK, M. A.; MATALAS, S. L.; NELSON, G. S. Transplanted acellular allograft dermal matrix. **Transplantation**. v. 60, p. 1-9, 1995.

LODOVICI, O. Fatores locais que interferem sobre a cicatrização. In: Netto, A. C. **Clínica cirúrgica**. São Paulo: Sarvier, p.139-144, 1994.

LONGO, L.; MESTER, A. Present and future of laser cicatrization. In: **Proceeding 2nd Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 10-11, 1998.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: princípios e prática**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2001.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410. Jul/Ago., 2003.

MARCON, K.; ANDRÉ, E. S. Efeitos do laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. **Revista de Fisioterapia da Universidade Regional de Blumenau**, v. 1, n. 1, fev, 2005.

McGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and organization of human skin. In: ROOK, A. et al. **Rook's Textbook of Dermatology**. 7 ed. New York: Wiley – Blackwell Publishing. v. 1, Cap. 3, p. 3.1-3.84, 2004.

MEDRADO, A. R. A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239-244, 2003.

MEIRELLES, G. C. S.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. B. A comparative study of the effects of laser photobiomodulation on the healing of third-degree burns: a histological study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 159-166, 2008.

MENDEZ, T. M. T. V.; PINHEIRO, A. L. B.; PACHECO, M. T. T.; NASCIMENTO, P. M.; RAMALHO, L. M. P. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of Cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, n. 1, p.19-25, 2004.

MENKE, N. B.; WARD, K. R.; WITTEN, T. M.; BONCHEV, D. G.; DIEGELMANN, R. F. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 19-25, 2007.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. Effect of laser rays on wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 122, p. 532-535, 1971.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

OHSHIRO, T. **Low Reactive-Level Laser Therapy Practical Application**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 3-10, 1991.

OHSHIRO, T.; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **The Keio Journal of Medicine**, v. 42, n. 4, p. 191-195, 1993.

ORTIZ, M. C. S.; CARRINHO, P. M.; SANTOS, A. A. S.; GONÇALVES, R. C.; PARIZOTTO, N. A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001a.

_____. Laser de baixa intensidade: efeito sobre os tecidos biológicos – parte 2. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 6, p. 337-352, nov./dez., 2001b.

PAIM, C. B. V.; RAISER, A. G.; CARDOSO, E.; BECK, C. Enxerto Autólogo de Pele, em Malha, com Espessura Completa, na Reparação de Feridas Carpometacarpianas de Cães. Resposta à Irradiação Laser AsGa. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 451-457, 2002.

PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. New York: Plenum Press, p. 459, 1984.

PARRISH, J. A.; DEUTSCH, T. Laser photomedicine. **Journal of Quantum Electronics**, v. QE-20, n. 12, p. 1386-1396, 1984.

PARRISH, J. A.; ROSEN, C. F.; GANGE, R. W. Therapeutic uses of light. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 453, p. 354-64, 1985.

PENG, L.; CHENG, X. R.; WANG, J. W.; XU, D. X.; WANG, G. Preparation and evaluation of porous chitosan/collagen scaffolds for periodontal tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, n. 3, p. 207-220, 2006.

PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. D. E. P.; MATSON, E.; MARQUES, M. M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, p. 263-267, 2002.

PLEPIS, A. M. G.; RODRIGUES, F. T.; FUSO, F. C.; MARTINS, V. C. A. Cytotoxicity and biocompatibility studies of acellular collagen matrices derived from porcine pericardium. **In: ECCOMAS – International Conference on Tissue Engineering**. Leiria, Portugal, July, p. 9-11, 2009.

PROZILLO, L. C. **Aspectos Estruturais e Morfométricos do Processo de Reparação Tecidual de Feridas Cutâneas Tratadas com Irradiação Laser e Polímero de Aminoácidos**. Dissertação (mestre em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 4, 307-313, 2003.

RAJARATNAN, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. **Laser Therapy**, v. 6, p. 107-112, 1994.

RAMOS, R. **Análise Histológica da Integração da Matriz de Regeneração Dérmica ao Organismo. Estudo Experimental em Ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REZENDE, S. B. **Ação do diodo laser emitindo em 830nm, sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas: estudo biométrico e histológico em ratos**. Dissertação (mestre profissional em lasers odontológicos) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M. S. **Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos; Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele**. Tese de doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) - Universidade São Paulo, São Paulo, 2000.

RIBEIRO, M. S.; SILVA, D. F. T.; ARAÚJO, C. E. N.; OLIVEIRA, S. F.; PELEGRINI, C. M. R.; ZORN, T. M. T.; ZECELL, D. M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 22, p. 59-66, 2004.

RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE JR, L. C.; RAMALHO, L. M. P.; PINHEIRO, A. L. B.; BONJARDIM, L. R.; CUNHA, S. S. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.

ROCHA JUNIOR, A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. R.; AARESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no reparo tecidual. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

RODRIGUES, F. T.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; CRUSCA, J. S.; SILVA JUNIOR, N. F.; PARIZOTTO, N. A. Patches de pericárdio porcino revestida com quitosana. **In: V Simpósio Ibero-americano de Quitina/ Sociedade Ibero-americana de Quitina**. Santiago, Chile, (Aceito), 2010.

RUBIN, L.; SCHWEITZER, S. The use of acellular biologic tissue patches in foot and ankle surgery. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 22, p. 533-552, 2005.

RUSZCZAK, Z.; SCHWARTZ, R. A. Modern aspects of wound healing an update. **Dermatologic Surgery**. v. 26, p. 219-229, 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SANTARELLI, G.; PARODI, R.; CARUSI, G. The use of a slowly resorbable collagen barrier in the regeneration of bone in deep wide defects: a case report. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 16, n. 1, p. 68-77, fev.,1996.

SAÚDE TOTAL. Disponível em:
<http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp> Acesso em 10 dez. 2009.

SCHAFFER, M.; SROKA, R.; FUCHS, C.; SCHRADER-REICHARDT, U.; SCHAFFER, P. M.; BUSH, M.; DÜHMKE, E. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 253-257, 1997.

SCHULZ III, J. T.; TOMPKINS, R. G.; BURKE, J. F. Artificial Skin. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 231-244, 2000.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A. D.; DEPOLO, A. A wound healing of animal and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 18, p. 67-73, 2000.

SILVEIRA, P. C. L.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Evaluation of mitochondria respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photoshchemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, p. 279-282, 2007.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, p. 265-385, 1998.

STARKEY, C. **Recursos Terapêuticos em Fisioterapia**. Barueri: Manole, 2001.

STEED, D. L. Wound-healing trajectories. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 547-555, 2003.

SUN, L. P.; WANG, S.; ZHANG, Z. W.; WANG, X. Y.; ZHANG, Q. Q. Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 4, 2009.

TANGSADTHAKUN, C.; KANOKPANONT, S.; SANCHAVANAKIT, N.; BANAPRASERT, T.; DAMRONGSAKKUL, S. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 16, n.1, p.37-44, 2006.

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização de laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 86-93, 1998.

TIPHLOVA, O. A.; KARU, T. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of *E. coli*. **Microbiology**, v. 60, p. 626-630, 1987.

TOMALAIMATE, A. et al. On the influence of desacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

TUNER, J.; HODE, L. **Low Level Laser Therapy: clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 1999.

VIEIRA, S. A. L. **Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais.** 49 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) Universidade de Franca, Franca-SP, 2006.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 16, n. 3, p. 159-165, 1998.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p. 497-505, 1989.

YU, H. S.; CHANG, K. L.; YU, C. L.; CHEN, J. W.; CHEN, G. S. Low energy He-Ne laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 593-596, 1996.

ANEXOS

Anexo A – Apreciação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 025/2009

Protocolo nº 027/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 34ª. Reunião, ocorrida em 18/08/2009, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Efeitos do Laser na Reparação Cutânea com Aplicação de Curativo de Pericário Porcino em Ratos**”, apresentado por Jaqueline de Souza Crusca, Nivaldo Antonio Parizotto, Nelson Ferreira da Silva Junior e Vivian Cury.

São Carlos, 19 de agosto de 2009.

Prof.^a. Dr.^a. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Anexo B – Tabela da Área da Lesão de Cada Animal dos Grupos Experimentais

Tabela 1 - Valores da área (cm²) da lesão de cada animal dos respectivos grupos experimentais – Ctrl (controle); Laser (tratados com Laser); Matriz (tratados com matriz de pericárdio); ML (tratados com matriz de pericárdio e laser); MQ (tratados com matriz de pericárdio associada a quitosana) e MQL (tratados com matriz de pericárdio associada a quitosana e laser).

Grupos Animais	Ctrl	Laser	Matriz	ML	MQ	MQL
01	0,28	0,41	0,43	0,26	0,24	0,20
02	0,27	0,48	0,46	0,18	0,26	0,19
03	0,30	0,43	0,44	0,16	0,28	0,18
04	0,29	0,45	0,41	0,21	0,23	0,19
05	0,25	0,50	0,47	0,29	0,24	0,21
06	0,28	0,50	0,50	0,27	0,16	0,22
07	0,29	0,58	0,49	0,25	0,22	0,20
08	0,30	0,56	0,50	0,28	0,19	0,18

Anexo C – Tabela com Dados Descritivos das Lesões dos Grupos Experimentais

Tabela 2 - Valores das médias e desvios padrão da área da lesão dos respectivos grupos experimentais – Ctrl; Laser; Matriz; ML; MQ e MQL.

Grupos	Ctrl	Laser	Matriz	ML	MQ	MQL
Média –cm²	0,2825	0,4887	0,4625	0,2375	0,2275	0,1962
Desvio Padrão	0,0166	0,0596	0,0337	0,0483	0,0380	0,0140

Anexo D – Tabela Descritiva para Análise Histológica

Tabela 3 - Descritiva para as variáveis Fibroblastos, Células Inflamatórias, Vasos Sanguíneos e Colágeno de acordo com os grupos

Grupos	Variáveis	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Ctrl	Fibroblasto	8	78,63	14,25	53,17	83,33	91,00
	C. Inflamatória	8	101,85	16,94	77,83	101,25	133,67
	Vasos	8	5,37	1,15	3,33	5,50	6,83
	Colágeno	8	58,84	3,11	53,61	57,64	63,08
Laser	Fibroblasto	8	55,83	12,22	36,33	61,75	66,17
	C. Inflamatória	8	126,31	19,65	101,67	129,67	147,83
	Vasos	8	6,83	1,80	4,17	6,75	10,50
	Colágeno	8	54,51	2,18	52,52	53,72	58,74
Matriz	Fibroblasto	8	71,31	11,46	55,17	71,83	89,33
	C. Inflamatória	8	132,40	7,90	118,00	132,33	144,33
	Vasos	8	4,48	0,59	3,50	4,67	5,17
	Colágeno	8	51,75	3,38	47,53	51,16	56,73
ML	Fibroblasto	8	85,40	12,66	69,50	83,17	109,00
	C. Inflamatória	8	97,67	8,92	85,50	99,42	112,33
	Vasos	8	7,46	1,25	5,83	7,33	9,50
	Colágeno	8	68,77	5,14	62,07	68,18	77,53
MQ	Fibroblasto	8	105,06	7,66	93,50	103,17	117,83
	C. Inflamatória	8	95,27	10,00	72,17	98,42	103,33
	Vasos	8	5,42	0,85	4,17	5,58	6,83
	Colágeno	8	69,50	3,31	63,28	70,93	72,77
MQL	Fibroblasto	8	108,58	8,09	98,33	106,9	119,83
	C. Inflamatória	8	94,15	8,30	83,17	93,00	105,67
	Vasos	8	3,98	0,91	3,00	3,67	5,50
	Colágeno	8	71,72	2,70	67,38	72,25	75,65

Anexo E – Tabela dos Resultados da Análise pelo Teste Tukey para Colágeno

Tabela 4 – Comparações dos grupos para variável Colágeno				
Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Ctrl - Laser	-3,67	0,023	-8,80	1,45
Ctrl - Matriz	-6,34	0,002	-11,48	-1,21
Ctrl - ML	10,57	0,000	5,44	15,71
Ctrl - MQ	11,31	0,000	6,18	16,44
Ctrl - MQL	13,53	0,000	8,40	18,67
Laser - Matriz	-2,67	0,068	-7,80	2,46
Laser – ML	14,25	0,000	9,12	19,38
Laser – MQ	14,99	0,000	9,85	20,12
Laser - MQL	17,21	0,000	12,07	22,34
Matriz – ML	16,92	0,000	11,79	22,06
Matriz - MQ	17,66	0,000	12,53	22,79
Matriz - MQL	19,88	0,000	14,75	25,01
ML – MQ	0,73	0,621	-4,39	5,87
ML - MQL	2,95	0,427	-2,17	8,09
MQ - MQL	2,22	0,810	-2,91	7,35

Anexo F – Tabela dos Resultados da Análise pelo Teste Tukey para Fibroblastos

Tabela 5 – Comparações dos grupos para variável Fibroblasto

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Ctrl – Laser	-22,79	0,004	-39,67	-5,91
Ctrl – Matriz	-7,31	0,277	-24,20	9,57
Ctrl – ML	6,77	0,332	-10,11	23,65
Ctrl – MQ	26,44	0,000	9,55	43,32
Ctrl – MQL	29,96	0,000	13,08	46,84
Laser - Matriz	15,48	0,020	-1,40	32,36
Laser – ML	29,56	0,000	12,68	46,45
Laser – MQ	49,23	0,000	32,35	66,11
Laser – MQL	52,75	0,000	35,87	69,63
Matriz – ML	14,08	0,035	-2,80	30,97
Matriz – MQ	33,75	0,000	16,87	50,63
Matriz - MQL	37,27	0,000	20,39	54,15
ML – MQ	19,67	0,002	2,78	36,55
ML – MQL	23,19	0,001	6,30	40,07
MQ – MQL	3,52	0,386	-13,36	20,40

Anexo G – Tabela dos Resultados da Análise pelo Teste Tukey para Células Inflamatórias

Tabela 6 – Comparações dos grupos para variável Células Inflamatórias

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Ctrl - Laser	24,46	0,018	5,35	43,57
Ctrl - Matriz	30,54	0,000	11,43	49,65
Ctrl - ML	-4,19	0,546	-23,30	14,92
Ctrl - MQ	-6,58	0,360	-25,69	12,52
Ctrl - MQL	-7,71	0,267	-26,82	11,40
Laser - Matriz	6,08	0,430	-13,02	25,19
Laser – ML	-28,65	0,002	-47,75	-9,54
Laser – MQ	-31,04	0,001	-50,15	-11,93
Laser - MQL	-32,17	0,001	-51,27	-13,06
Matriz – ML	-34,73	0,000	-53,84	-15,62
Matriz - MQ	-37,12	0,000	-56,23	-18,02
Matriz - MQL	-38,25	0,000	-57,36	-19,14
ML – MQ	-2,40	0,621	-21,50	16,71
ML - MQL	-3,52	0,427	-22,63	15,59
MQ - MQL	-1,12	0,810	-20,23	17,98

Anexo H – Tabela dos Resultados da Análise pelo Teste Tukey para Vasos Sanguíneos

Tabela 7 – Comparações dos grupos para variável Vasos Sanguíneos

Comparações	Estimativas	P-valor	IC (95%)	
			LI	LS
Ctrl – Laser	1,45	0,074	-0,26	3,18
Ctrl – Matriz	-0,89	0,071	-2,62	0,82
Ctrl – ML	2,08	0,004	0,35	3,80
Ctrl – MQ	0,04	0,935	-1,68	1,76
Ctrl – MQL	-1,39	0,018	-3,12	0,32
Laser - Matriz	-2,35	0,003	-4,07	-0,62
Laser – ML	0,62	0,433	-1,10	2,35
Laser – MQ	-1,41	0,063	-3,14	0,30
Laser – MQL	-2,85	0,001	-4,57	-1,12
Matriz – ML	2,97	0,000	1,25	4,70
Matriz – MQ	0,93	0,022	-0,78	2,66
Matriz - MQL	-0,50	0,214	-2,22	1,22
ML – MQ	-2,04	0,002	-3,76	-0,31
ML – MQL	-3,47	0,000	-5,20	-1,75
MQ – MQL	-1,43	0,006	-3,16	0,28