



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DE
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS**

PATRICIA BRASSOLATTI

SÃO CARLOS – SP

2015

PATRICIA BRASSOLATTI

**EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DE
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.**

Orientadores: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini

SÃO CARLOS – SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B823e Brassolatti, Patricia
Efeitos da terapia laser de baixa intensidade e
de membranas de celulose bacteriana no tratamento de
queimaduras de terceiro grau em ratos / Patricia
Brassolatti. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
135 p.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Biomateriais. 2. Membranas de celulose
bacteriana. 3. LLLT. 4. Queimaduras. I. Título.




Folha de Aprovação

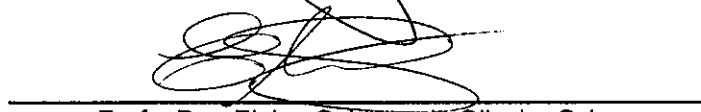
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Patricia Brassolatti, realizada em 29/10/2015:



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar



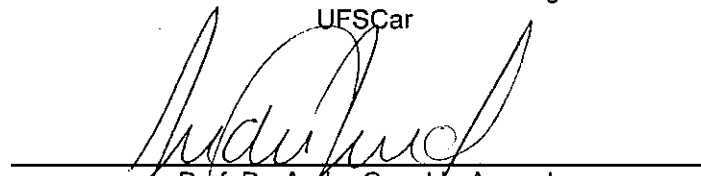
Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar



Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro
USP



Profa. Dra. Ana Elisa Serafim Jorge
UFSCar



Prof. Dr. Andre Capaldo Amaral
UNIARA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão,

com todo o amor, respeito e carinho,

Pelo exemplo de vida e por tudo que representam para mim!

Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Àos meus Orientadores,

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pessoa íntegra que transborda sabedoria e humildade, exemplo não somente de um verdadeiro profissional, mas também um exemplo de ser humano. Agradeço pela confiança depositada neste Projeto, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por me inserir na vida acadêmica e pela contribuição fornecida ao longo deste período para o meu crescimento pessoal e profissional. A você minha eterna admiração, respeito e gratidão.

Prof. Dr. Fernando M. Araújo Moreira, pessoa que exala alegria por onde passa. Agradeço pelo acolhimento, confiança e oportunidade dispensada nesta caminhada, pelo incentivo de seguir a área acadêmica e principalmente por acreditar neste Projeto de Pesquisa. A você meu respeito e gratidão.

Ao meu Co-Orientador, Professor Dr. Paulo Sérgio Bossini, pessoa admirável de enorme coração, que não mede esforços para ensinar seus alunos e ademais companheiros de trabalho, um exemplo de amor pela profissão e de respeito ao próximo. Agradeço por todo ensinamento, conselhos e atenção a mim concedidos, e também pela confiança e credibilidade que foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste Projeto. Obrigada pela amizade construída ao longo deste período, e por me incentivar a aprender e a compartilhar o conhecimento de forma justa e verdadeira. A você minha eterna admiração e gratidão.

À Dra. Luciana Almeida Lopes, um exemplo de determinação e dedicação, pela qual tive a oportunidade de conhecer e conviver. Agradeço pela confiança, credibilidade, atenção e ajuda, e acima de tudo por ter me proporcionado viver e realizar este sonho. Me faltam palavras para expressar o quanto este Projeto representa em minha vida. A você minha eterna gratidão e admiração. Obrigada pela parceria, amizade e pela cumplicidade conquistada ao longo deste tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades e bênçãos concedidas,

Aos meus pais, Luzia e José, pelo amor incondicional, carinho, exemplo de perseverança e vida. Agradeço por serem estes pais maravilhosos, pelo incentivo e atenção concedido em cada minuto da minha vida, pelos conselhos, ensinamentos, por me proporcionarem as melhores oportunidades, e principalmente por acreditarem e viverem este sonho comigo. Obrigada por estarem ao meu lado em todas as decisões da minha vida. A vocês minha eterna admiração, gratidão, respeito e amor incondicional,

Ao meu irmão Marcelo e minha cunhada Tatiane, pelo apoio concedido. Agradeço especialmente meu irmão por ter colaborado e participado da construção deste Projeto, por todo o incentivo dado ao longo deste tempo e de toda minha vida. A você meu eterno carinho e admiração.

À minha sobrinha Ana Laura, pelo amor e por todos os momentos incríveis de alegria que me proporciona. Você chegou em minha vida juntamente com o início desta caminhada e durante este período conseguiu me ensinar que nos pequenos e mais simples gestos de alegria encontramos a verdadeira felicidade. Obrigada por mesmo que tão pequenininha, estar sempre ao meu lado. À você meu eterno amor.

Aos Diretores Dr. Renaldo e Dr. Luciana, da Empresa DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, e ao Núcleo de Pesquisa NUPEN pela parceria e colaboração estabelecidas para o desenvolvimento deste trabalho,

A todos os funcionários da Empresa DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, em especial a Ana, Alessandra, Amanda e Clóvis que acompanharam diretamente a evolução deste Projeto e por toda atenção dispensada neste período,

Aos químicos responsáveis pelo desenvolvimento do Biomaterial utilizado neste trabalho e pertencentes ao Núcleo de Pesquisas da Empresa DMC, Dra. Lisinéia Maria Zanardi e Me. Marcos Aurélio Napolitano pela atenção, credibilidade, contribuição dispensada e pela amizade construída ao longo deste convívio. A vocês minha admiração e respeito.

Aos professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar, em especial ao Dr. Luis Carlos Trevelin e a secretária Cláudia Pastega, pela disponibilidade, atenção e por ter proporcionado condições para que eu pudesse desenvolver o meu projeto de pesquisa. A todos, a minha eterna gratidão.

Aos alunos do Departamento de Biotecnologia da UFSCar, que conviveram comigo no período de aulas, e as amizades construídas neste período.

À Maria Carolina, minha primeira aluna de Iniciação Científica vinculada a este Projeto, da qual pude acompanhar e orientar, pela colaboração, dedicação e amizade construída ao longo deste período.

À Professora Dra. Lucimar Retto da Silva de Avó do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Carlos pela disponibilidade, atenção e por todo ensinamento que foram essenciais para a conclusão deste estudo.

A EMBRAPA Instrumentação - São Carlos, pela parceria estabelecida, em especial a Professora Dr. Lucimara e as técnicas Silviane e Viviane pela ajuda, atenção e contribuição para o presente estudo.

Aos meus queridos amigos e companheiros do Laboratório de Recursos Terapêuticos, pelo carinho, pelas colaborações e ensinamentos, que foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional, e pelos momentos agradáveis e divertidos proporcionados durante nossos experimentos e encontros.

Aos servidores da UFSCar, especialmente ao Roberto e Revair do Biotério Central e à Iolanda do Departamento de Fisioterapia, pela disponibilidade e por toda a atenção concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos os amigos que adquiri ao longo desta caminhada,

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Deus é o dono de tudo. Devo a ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não tem essa oportunidade. Ele a deu a mim, não sei porque. Sei que não devo desperdiçá-la”.

(Ayrton Senna)

RESUMO

Queimaduras representam mundialmente alto risco de morbidade e mortalidade. Nas consideradas severas ou profundas, o processo de cicatrização é complexo e necessita da participação de diversas linhagens celulares. Dentre os tratamentos existentes, os biomateriais e a Terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) vêm se destacando por apresentar propriedades que favorecem e estimulam o processo de cicatrização. Assim, foram realizados três estudos com o objetivo de avaliar os efeitos das membranas de celulose bacteriana pura e com lidocaína e da LLLT (660 nm) em duas fluências diferentes ($12,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $25\text{J}/\text{cm}^2$), utilizados independentemente ou associados, em queimaduras de terceiro grau em ratos. A queimadura foi realizada através de uma placa de alumínio acoplada a um ferro de solda aquecido a 150°C , pressionado no dorso do animal por 10 segundos. No primeiro estudo a ação das membranas de celulose bacteriana pura e acrescida de lidocaína foram avaliados. Para isso, foram estabelecidos três grupos experimentais divididos em GC (grupo controle), GM (grupo queimadura tratado com a membrana de celulose bacteriana pura) e GML (grupo queimadura tratado com a membrana de celulose acrescida de lidocaína). Os grupos tratados com as membranas demonstraram um processo de cicatrização avançado quando comparado ao grupo controle. Na análise da imunexpressão da COX-2, os grupos tratados apresentaram a imunexpressão de forma leve, o que evidencia características de tecido reparado. Assim, concluímos que os curativos biológicos a base de celulose bacteriana, foram efetivos, proporcionando um ambiente favorável para a evolução do processo de cicatrização. No segundo estudo, foram avaliados os efeitos da LLLT com duas diferentes fluências ($12,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $25\text{J}/\text{cm}^2$) em três grupos experimentais, divididos em GC (grupo controle), GL12,5 (grupo queimadura tratado com $12,5\text{J}/\text{cm}^2$) e GL25 (grupo queimadura tratado com $25\text{J}/\text{cm}^2$). Os animais receberam a aplicação da LLLT imediatamente após a indução da lesão e nos dias 2, 4, 6 e 8 subsequentes, em cinco pontos distintos, sendo quatro localizados nas bordas da ferida e um na região central. O GL25 demonstrou os melhores resultados, com maior imunexpressão do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), maior quantidade de vasos sanguíneos e menor imunexpressão da COX-2 (Ciclooxigenase-2) quando comparado aos grupos GC e GL12,5. Com isso, foi possível concluir que a maior fluência, bem como a maior energia depositada no tecido foi mais eficaz em estimular o processo de cicatrização em queimaduras de terceiro grau em ratos. No terceiro estudo foi abordada a associação da membrana de celulose bacteriana pura com a LLLT (660 nm, $25\text{J}/\text{cm}^2$). Quatro grupos foram avaliados, GC (grupo controle), GM (grupo queimadura tratado com membrana de celulose bacteriana pura), GL (grupo queimadura tratado com laser $25\text{J}/\text{cm}^2$) e GM+L (grupo queimadura tratado com membrana de celulose bacteriana + LLLT). Os achados histológicos demonstraram que os grupos que receberam os tratamentos apresentaram melhores resultados no processo de cicatrização quando comparados ao grupo controle. O (GM+L) apresentou resultados similares aos achados no GL, evidenciando os efeitos estimuladores da angiogênese fornecidos pela luz laser. O GM apresentou avanço no processo de cicatrização, evidenciando a fase proliferativa. Assim, apesar da LLLT apresentar os efeitos pró-inflamatórios esperados, que modulam a fase inflamatória e favorecem a regeneração tecidual, a ação isolada da membrana de celulose bacteriana demonstrou vantagens no tratamento por apresentar características morfológicas teciduais compatíveis a um processo de cicatrização mais avançado.

Palavras-chave: Biomateriais, Membranas de Celulose Bacteriana, LLLT; Queimaduras.

ABSTRACT

Burn injuries represent a high risk of morbidity and mortality worldwide. In severe and deep injuries, the wound healing process is complex and requires the participation of different types of cells. Among the existing treatments, biomaterials and LLLT are highlighted for having properties that favor and stimulate the healing process. Thus, three studies were conducted to evaluate the effects of bacterial cellulose membranes in its pure state or enriched with lidocaine and LLLT (660 nm) in two different fluences ($12.5\text{J}/\text{cm}^2$ and $25\text{J}/\text{cm}^2$) used independently or associated, on third-degree burns in rats. The burn was induced with an aluminum plate at 150°C , pressed onto the animal's back for 10 seconds. In the first study the action of bacterial cellulose membrane in its pure state and enriched with lidocaine, as biological dressings was evaluated. Therefore, the rats were divided in three experimental groups, CG (control group), MG (group treated with the pure bacterial cellulose membrane), and MLG (group treated with the bacterial cellulose membrane with lidocaine). The treated groups showed an advanced wound healing when compared to the control group. In the immunohistochemical analysis of COX-2, the treated groups showed a light immunoexpression, with the characteristics of repaired tissue. Thus, bacterial cellulose-based biological dressings were effective and provided a favorable environment for the development of the healing process. In the second study, the effects of LLLT with two different fluences ($12.5\text{J}/\text{cm}^2$ and $25\text{J}/\text{cm}^2$) in three experimental groups, divided into CG (control group), LG12.5 (burning treated group $12.5\text{J}/\text{cm}^2$) and LG25 (burn group treated with $25\text{J}/\text{cm}^2$) were evaluated. The animals received laser application immediately after the induction of the lesion and the subsequent doses 2, 4, 6 and 8 days after the induction, at five different points, four on the edges of the wound and one in the central region. The LG25 had better results, with higher number of blood vessels, increased immunoexpression of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and decreased immunoexpression of COX-2 (Cyclooxygenase-2) when compared to CG and GL12.5 groups. The LG12.5 showed the longest delay in the progression of the healing process, due to its intense inflammation and tissue fibrosis when compared to CG and LG25. In the third study the association of pure bacterial cellulose membrane and LLLT (660 nm, $25\text{J}/\text{cm}^2$) was investigated. Four groups were evaluated, CG (control group), MG (burn group treated with pure bacterial cellulose membrane), LG (burn group treated with laser $25\text{J}/\text{cm}^2$) and MG + L (burn group treated with bacterial cellulose membrane + LLLT). Histological findings demonstrated that the treated group showed better results in the healing process. The (GM + L) showed results similar to those found in the GL, evidencing the stimulatory effects of angiogenesis provided by the laser light. GM showed improvement in the healing process, indicating the proliferative phase. However, although LLLT presented the expected pro-inflammatory effects, which modulate the inflammatory phase and favor tissue regeneration, the isolated action of the bacterial cellulose membrane proved to be advantageous by presenting tissue characteristics, which are compatible with a more advanced phase of the healing process.

Key-words: Bacterial cellulose membrane, Biomaterials, Burns, Low-Level Laser Therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT	= Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	= Análise de Variância
ATP	= Adenosina Trifosfato
ATR	= <i>Attenuated Total Reflection</i>
BIOCEL	= Marca registrada das membranas de celulose bacteriana
cm ²	= Centímetros Quadrados
cm ⁻¹	= Centímetros elevados a -1
COX-2	= Ciclooxygenase-2
C=C	= Ligação dupla de Carbono
CH	= Carbono Hidrogênio
C-O-C	= Carbono-Oxigênio-Carbono
DNA	= Ácido Desoxirribonucleico
DE	= Derme
EP	= Epiderme
EMBRAPA	= Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	= <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
G	= gramas
GC	= Grupo Controle
GM	= Grupo membrana de celulose bacteriana pura
GML	= Grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína 4%
GL12.5	= Grupo Laser com fluência de 12.5 J/cm ²
GL25	= Grupo Laser com fluência de 25 J/cm ²
GL	= Grupo Laser
GM+L	= Grupo membrana de celulose bacteriana pura e Laser 25 J/cm ²
HE	= Hematoxilina

IL-8	= Interleucina 8
IMAGE J	= Programa de imagens Image J
J	= Joules
J/cm ²	= Joules por centímetro quadrado
LLLT	= Low-Level Laser Therapy (Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade)
MP	= Membrana de celulose bacteriana pura
ML	= Membrana de celulose bacteriana enriquecida com lidocaína 4%
mW	= miliWatts
Min	= Minutos
mg/Kg	= Miligramas/quilogramas
mg/Kg ⁻¹	= Miligramas/quilogramas elevado a -1
ml	= Mililitros
Nm	= Nanômetros
N-H	= Nitrogênio – Hidrogênio
NUPEN	= Núcleo de Pesquisa e Ensino de Fototerapia nas Ciências da Saúde
OH	= Hidroxila
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNIFESP	= Universidade Federal de São Paulo
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
µm	= Micrometros
%	= Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. - Procedimento da lesão de queimadura. (A) tricotomia digital; (B) equipamento de ferro de solda com a placa de alumínio de 1 cm² acoplada a sua extremidade e termostato demonstrando a temperatura de 150 °C; (C) placa de alumínio pressionada no dorso do animal por 10 segundos; (D) extensão da área queimada de 1 cm².....33

Figura 2. - Membranas de celulose bacteriana pura e enriquecida com lidocaína. (A) Microscopia eletrônica de varredura (20x) da membrana de celulose bacteriana pura, demonstrando as nanofibras e a formação da sua estrutura macromolecular; (B) Membrana de celulose bacteriana pura; (C) Microscopia eletrônica de varredura (20x) da membrana de celulose acrescida de lidocaína 4%, demonstrando as nanofibras e a formação da sua estrutura macromolecular; (D) Membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína 4%; 35

Figura 3. - Foto ilustrativa demonstrando a aplicação da membrana de celulose bacteriana na região da queimadura. (A) Aplicação da membrana de celulose bacteriana. (B) demonstração da aderência da membrana de celulose bacteriana sobre a região da queimadura.....36

Figura 4. - Tratamento com a terapia *laser* de baixa intensidade: (A) equipamento emissor da radiação *laser*; (B) imagem representativa da aplicação da irradiação na queimadura, demonstrando apenas o ponto central da região da lesão37

Figura 5. - Espectro de FTIR-ATR das membranas de celulose bacteriana. Espectro da membrana de celulose bacteriana pura (MP), evidenciando as bandas características em aproximadamente 3.300 cm⁻¹ relacionado às vibrações de OH e em 1.100 cm⁻¹ relacionado aos polissacarídeos. Espectro da membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína (ML), evidenciando suas bandas características em 3.250 cm⁻¹ relacionado às ligações N-H e 1.550 cm⁻¹ relacionado à ligação C=C do anel aromático da estrutura química da lidocaína em seu estado puro53

Figura 6. - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais coradas com hematoxilina e eosina. (EP) epiderme, (DE) derme, (*) fibrose, (seta preta) anexos da pele, (▼) infiltrado inflamatório. A - grupo controle representando a pele somente com a lesão, B - grupo membrana de celulose bacteriana (GM), C - grupo membrana de celulose bacteriana com lidocaína (GML).....54

Figura 7. - Quantificação de infiltrado inflamatório. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) - grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína. * $p \leq 0,05$ versus GM e GML.....55

Figura 8. - Número de vasos sanguíneos. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) - membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína.....56

Figura 9. - Birrefringência de fibras de colágeno. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana pura; (GML) - grupo membrana acrescida de lidocaína.....57

Figura 10. - Fotomicrografias representativas da imunoexpressão da COX-2 (setas). A- grupo controle mostrando intensa marcação representada em marrom das células da COX-2 (seta). B- grupo membrana de celulose bacteriana pura (GM) e C- grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína (GML)58

Figura 11. - Imunoexpressão da COX-2. (GC) - grupo controle, (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) - grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína. * $p \leq 0,05$ versus GM e GML.....59

Figura 12. - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. (DE) derme, (#) fibrose, (▲) infiltrado inflamatório, (seta preta) vaso sanguíneo. A - grupo controle representando a pele somente com a queimadura (GC), B – grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm² (GL12,5), C – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm² (GL25) HE, bar = 40µm76

Figura 13. - Número de vasos sanguíneos. (GC) - grupo controle; (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (GL25) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC e GL12,5.....77

Figura 14. - Porcentagem de fibras de colágeno. (GC) - grupo controle; (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (GL25) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC e GL25.....78

Figura 15. - Imunohistoquímica da COX-2: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². As setas indicam a imunomarcagem da COX-2 nos tecidos79

Figure 16. - Análise semi-quantitativa da COX-2 determinada através de escore. (CG) grupo controle, (GL12,5) – grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm², (GL25) – grupo tratado com LLLL na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC e GL12.5.....80

Figura 17. - Imunohistoquímica do VEGF: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². Setas mostram a imunomarcagem dos vasos no tecido81

Figura 18. – Análise semi-quantitativa do VEGF, determinada através de score. (GC) - grupo controle, (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5J/cm², (GL25) – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC; # p ≤ 0,05 versus GC e GL12,5.....82

Figura 19. - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. (DE) derme, (#) fibrose, (▲) infiltrado inflamatório, (seta preta) vaso sanguíneo. A - grupo controle representando a pele somente com a queimadura (GC), B – grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura (GM), C – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm² (GL), D – grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². HE, bar = 40µm.....98

Figura 20. - Número de vasos sanguíneos. (CG) - grupo controle; (GM) - grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm², (GM+L) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana e LLLT com fluência de 25 J/cm². *p ≤ 0,05 versus GC e GM.....99

Figura 21. - Birrefringência de fibras de colágeno. (GC) grupo controle; (GM) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (GL) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm²; (GM+L) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT com fluência de 25 J/cm².....100

Figura 22. - Imunohistoquímica da COX-2. (A) grupo controle; (B) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (C) grupo tratado com LLLT; (D) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT. As setas indicam os locais de marcação na coloração marrom, que indicam a presença da COX-2 no tecido. bar=40µm.....102

Figure 23. - Análise semi-quantitativa da COX-2 determinada através de escore. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com LLLL na fluência de 25 J/cm²; (GM+L) - grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC, GL e GM+L; # p ≤ 0,05 versus GM e GM+L.....103

Figura 24. - Imunohistoquímica do VEGF: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm²; (D) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². Setas mostram a imunomarcação dos vasos no tecido104

Figura 25. - Análise semi-quantitativa do VEGF determinada através de score. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com laser na fluência de 25 J/cm²; (GM+L) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC.....105

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese foi estruturada na forma de artigos, dividida em três partes principais e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte é constituída de uma contextualização, objetivos e detalhamento da metodologia empregada. A segunda parte é composta por três estudos, baseados fundamentalmente nas colocações expostas na primeira parte. O primeiro estudo aborda a ação dos biomateriais utilizados neste estudo, as membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e acrescida de lidocaína, no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau, intitulado “*Biological bacterial cellulose-based dressings for the treatment of third-degree burns in rats*”, submetido ao periódico “*Journal of Tissue Viability*”. O segundo trabalho aborda os efeitos a avaliação de dois parâmetros de tratamentos distintos da terapia laser de baixa intensidade no processo de cicatrização, denominado “*Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy in wound healing on third-degree burns in rats.*”, redigido de acordo com as normas do periódico, “*Microscopy research and techniques*” no qual foi submetido. O terceiro artigo intitulado “*Effects of associated bacterial cellulose membrane and low-level laser therapy on third-degree burn wound healing in rats*”, aborda a avaliação da associação de dois dos tratamentos avaliados anteriormente (membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e a LLLT), e foi submetido ao periódico “*Journal of applied biomaterials and functional materials*”. A terceira parte é composta pelas considerações finais, perspectivas futuras, referências bibliográficas e anexos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO DA TESE

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	22
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Principal	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais de Experimentação	31
3.2 Procedimento da Queimadura	32
3.3 Delineamento Experimental	33
4. TRATAMENTOS	34
4.1 Membranas de Celulose Bacteriana	34
4.2 Terapia laser de baixa intensidade	36
4.3 Eutanásia	37
4.4 Coleta das amostras	37
4.5 Análises	37
4.5.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	37
4.5.2 Análise Histopatológica	38
4.5.3 Morfometria de Vasos Sanguíneos	39
4.5.4 Birrefringência	39

4.5.5 Análise Imunohistoquímica	40
4.6 Análise Estatística	41

PARTE II

5. ESTUDO I	43
5.1 RESUMO	43
5.2 INTRODUÇÃO	44
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.3.1 Membranas de Celulose Bacteriana	48
5.3.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	48
5.3.3 Análise Histopatológica	49
5.3.4 Morfometria de Vasos Sanguíneos	49
5.3.5 Birrefringência	50
5.3.6 Análise Imunohistoquímica	50
5.3.7 Análise Estatística	51
5.4 RESULTADOS	52
5.4.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	52
5.4.2 Análise Histopatológica	53
5.4.3 Morfometria de Vasos Sanguíneos	55
5.4.4 Birrefringência	56
5.4.5 Análise Imunohistoquímica	57
5.5 Discussão	59
5.6 Referências Bibliográficas	64

6. ESTUDO II	67
6.1 Resumo	67
6.2 Introdução	68
6.3 Materiais e Métodos	70
6.3.1 Delineamento Experimental	70
6.3.2 Procedimento da Queimadura	71
6.3.3 Terapia laser de baixa intensidade	71
6.3.4 Análise Histopatológica	72
6.3.5 Morfometria de Vasos Sanguíneos	72
6.3.6 Birrefringência	73
6.3.7 Análise Imunohistoquímica	74
6.3.8 Análise Estatística	75
6.4 Resultados	75
6.4.1 Análise histopatológica	75
6.4.2 Morfometria de vasos sanguíneos	76
6.4.3 Birrefringência	77
6.4.4 Análise Imunohistoquímica	78
6.5 Discussão	82
6.6 Referências Bibliográficas	86
7. ESTUDO III	89
7.1 Resumo	89
7.2 Introdução	90
7.3 Materiais e Métodos	92
7.3.1 Membranas de Celulose Bacteriana	93
7.3.2 Terapia <i>laser</i> de Baixa Intensidade	93

7.3.3	Análise Histopatológica	94
7.3.4	Morfometria de Vasos Sanguíneos	94
7.3.5	Birrefringência	95
7.3.6	Análise Imunohistoquímica	96
7.3.7	Análise Estatística	97
7.4	Resultados	97
7.4.1	Análise Histopatológica	97
7.4.2	Morfometria de Vasos Sanguíneos	99
7.4.3	Birrefringência	100
7.4.4	Análise Imunohistoquímica	101
7.5	Discussão	105
7.6	Referências Bibliográficas	109

PARTE III

8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS	117
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS		
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	125
	ANEXO B – Laudo Patológico	127
	ANEXO C – Submissão do Estudo I	130
	ANEXO D – Submissão do Estudo II	132
	ANEXO E – Submissão do Estudo III	134

PARTE I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

2. OBJETIVOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Queimaduras são definidas como lesões de pele ou outros tecidos corporais que ocorrem principalmente por trauma térmico agudo, causados por líquidos quentes, fogo e eletricidade (PECK, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde, este tipo de lesão apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, levando a aproximadamente 195.000 casos de óbito ao ano e, portanto, são consideradas um dos principais problemas de saúde pública, cuja gravidade está diretamente associada ao agente agressor e a extensão e profundidade da área atingida (KNABL et al., 1999; PESSOLATO et al., 2011).

A classificação da lesão é realizada de acordo com as camadas da pele atingidas e descritas como queimaduras de primeiro, segundo ou terceiro graus (EZZATI; BAYAT; KHOSHVAGHTI, 2009; TIWARI, 2012; SOUZA et al., 2014). As lesões de primeiro grau são consideradas superficiais por atingir apenas a epiderme, não provocam alterações hemodinâmicas e são caracterizadas por dor e eritema local; as lesões consideradas de segundo grau, atingem a epiderme e uma porção da derme, comprometem parte dos anexos da pele e são caracterizadas por bolha epidérmica e dor severa; e as lesões de terceiro grau são consideradas lesões severas por comprometer a extensão total do tecido (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2010; MUANGMAN, et al., 2011; TIWARI, 2012), ocasionando alto estresse fisiológico. Neste último caso, é ainda observado trombose dos vasos sanguíneos e presença de necrose tecidual que podem contribuir para o estabelecimento de uma repercussão infecciosa sistêmica, uma vez que as bactérias utilizam este tecido como nutriente para sua proliferação (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2010; MONTES; BARBOSA; NETO; 2011).

A resposta do organismo frente a lesão inicia-se com o processo de cicatrização, que é considerado complexo (SUN et al., 2011) e é dividido em fases fundamentais e sobrepostas, como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (SCHWACHA et al., 2010; SUN

et al., 2011; RAMBO et al., 2014). O início do processo é dedicado a hemostasia, com formação de uma matriz provisória, o que ocorre imediatamente após o estabelecimento da lesão, e é concluída após algumas horas.

Logo em seguida, tem início a inflamação, caracterizada inicialmente pelo recrutamento de neutrófilos, que são células especializadas em realizar a fagocitose e secretar proteases para combater bactérias, bem como degradar o tecido necrosado. Além disso, os neutrófilos liberam mediadores inflamatórios que amplificam esta resposta e estimulam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8), que atuarão diretamente no processo de reparo. A fase tardia da inflamação é caracterizada pela presença de macrófagos, que continuam o trabalho de fagocitose e desbridamento celular e são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e citocinas específicos, que estimulam a próxima fase do processo (ENOCK; LEAPER, 2007; SCHWACHA et al., 2010; REINKE; SORG, 2012). Em suma, a resposta inflamatória é essencial para fornecer os fatores de crescimento e as citocinas responsáveis pelo movimento tecidual e celular que são cruciais para o subsequente mecanismo de reparo tecidual em mamíferos. Há evidências de que a quantidade da inflamação, bem como sua evolução podem estar diretamente relacionadas a extensão e formação do tipo de cicatriz (ROWAN et al., 2015).

Na continuidade do processo, ocorre a proliferação, que acontece entre o terceiro e décimo dia após o estabelecimento da lesão. A característica principal apresentada por esta fase é a formação de tecido de granulação, com a presença de fibroblastos, que desempenham importante papel por possuir diferentes funções, como síntese de colágeno e de substâncias como fibronectina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e ácido hialurônico, que compõem a estrutura da nova matriz e atuam como suporte para a movimentação e migração celular, além de ser considerado um tecido altamente vascularizado. Outra característica a ser destacada é a capacidade de diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos que adquirem propriedades

contráteis e auxiliam o processo de contração das bordas da ferida (ENOCH; LEAPER, 2007; REINKE; SORG, 2012).

Por fim, inicia-se o processo de remodelamento. Nesta etapa a síntese do colágeno tipo III é cessada, e as fibras previamente formadas sofrem um processo de maturação, onde são substituídas por colágeno tipo I, que são fibras mais fortes e espessas. Assim, o final do processo é caracterizado pela total contração das bordas da ferida e pela diminuição do processo de angiogênese, onde a microcirculação retorna aos níveis considerados normais (MARTIN, 1997; ENOCH; LEAPER, 2007; REINKE; SORG, 2012; ROWAN et al., 2015).

Nos casos de lesões profundas como as queimaduras de terceiro grau, onde há perda significativa de tecido, o processo de cicatrização ocorre por segunda intenção, cuja fase inflamatória e produção de tecido de granulação geralmente encontram-se exacerbadas (HALLORAN; SLAVIN, 2002; ENOCH; LEAPER, 2007). Desequilíbrios neste processo geralmente acarretam em cicatrizes hipertróficas e/ou retrações teciduais que, dependendo da área em que se encontram, promovem importantes limitações funcionais (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; SOTO-PANTOJA et al., 2014; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; ARGINOVA; HADJISKI; VICTOROVA, 2006), sendo por isso considerados os casos mais críticos dentro da área de medicina regenerativa (CHEN et al., 2011; POPESCU et al., 2011), e um dos maiores desafios nos campos da cirurgia plástica e reconstrutiva (BRAZIULIS et al., 2012).

A fim de auxiliar o processo de cicatrização e minimizar qualquer tipo de intercorrência durante sua evolução, algumas estratégias de tratamento são indicadas. Uma das técnicas mais utilizadas em queimaduras profundas são os enxertos de pele, porém, mediante a observação de resultados estéticos e funcionais insatisfatórios devido a rejeição e/ou contração tecidual, bem como, limitadas áreas de tecido sadio encontradas para servirem como doadoras em

paciente que apresentam queimaduras extensas, novas abordagens de tratamento vêm sendo avaliadas (TRAJANO et al., 2015; ZHANG et al., 2008).

Diante disso, são crescentes as investigações e investimentos em áreas que unem ciência e tecnologia, na intenção de buscar e explorar novas intervenções de tratamento que promovam vantagens ao processo de cicatrização. Neste sentido, duas novas abordagens de tratamento distintas se destacam (BAXTER et al., 2013; CZAJA et al., 2007; CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009; CZAJA et al., 2007; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014). A primeira é destinada ao desenvolvimento de biomateriais que funcionam como substitutos temporários de pele e tem como finalidade proteger o ambiente da lesão (CZAJA et al., 2007; CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009; BAXTER et al., 2013; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; ROWAN et al., 2015), e a segunda é direcionada ao uso da terapia *laser* de baixa intensidade, do inglês (*Low-Level Laser Therapy – LLLT*), como recurso terapêutico devido a suas propriedades bioquímicas e biofísicas atuantes no ambiente celular (BAXTER et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

Os biomateriais são classificados em duas categorias distintas: naturais e sintéticos, que tem como finalidade melhorar a funcionalidade de órgãos e/ou tecidos (LABUS; KAWECKI; NOWAK, 2012).

Dentre os biopolímeros, a celulose bacteriana vem despertando, grande interesse científico atualmente. Celulose bacteriana é um polissacarídeo extracelular produzido em meio de cultura estático, por diversas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *Agrobacter*, *Sarcina* entre outros, na forma de membranas altamente hidratadas (ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; AVILA et al., 2014). Tais membranas, são formadas por uma rede de polímeros com fibrilas de celulose menores que 100 nm de largura, com 2 a 4 nm diâmetro de espessura. Em termos de forma molecular é similar à celulose produzida por plantas, mas apresenta características e propriedades estruturais diferentes e importantes, como elevada pureza, alto grau de

polimerização, alta cristalinidade (70-80%), alto conteúdo de água (99%) e boa estabilidade (BARUD, et al., 2011).

Outras características a serem ressaltadas são boa aderência e permeabilidade seletiva, propriedade fundamental por ser capaz de favorecer a passagem de vapor de água ao mesmo tempo em que impede a passagem de micro-organismos nocivos ao organismo. Ademais, sua transparência auxilia o acompanhamento visual da evolução do processo de cicatrização, sendo por isso de grande interesse comercial para aplicações médicas (SASKA et al., 2011) e indicado nos casos de lesões graves, como úlceras profundas de difícil cicatrização (OSMAN; SOUZA; DOLCI, 2007; SASKA et al., 2011).

Evidências de sua contribuição ao processo de cicatrização foram avaliada no estudo de Muangman et al. (2011). Em um estudo de caso clínico, os autores avaliaram a aplicação de microcelulose bacteriana em queimadura de segundo grau em face e relataram encontrar resultados positivos no processo de cicatrização com adequada proteção da região acometida. Além disso, é importante destacar que os autores sugerem que este tipo de biomaterial pode ser indicado não somente no tratamento de queimaduras de segundo grau, mas também em outras aplicações clínicas.

Outro achado relevante em relação à estrutura da membrana formada por celulose bacteriana é sua capacidade de atuar como precisos sistemas de transportes de drogas, por favorecer a incorporação de substâncias específicas em sua rede macromolecular.

Antiinflamatórios, analgésicos e anestésicos, substâncias utilizadas em aplicação transcutânea, estão entre os medicamentos estudados (TROVATTI et al., 2011; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014). A lidocaína, por exemplo, um anestésico tópico utilizado para bloquear de forma reversível a condução de estímulos nervosos, pode ser incorporado de maneira fácil e efetiva neste tipo de membrana. A partir disso, quando em contato com a área a ser tratada, sua atuação poderá promover tanto efeito analgésico local, quanto atuar de forma

intrínseca ao processo de cicatrização, inibindo a síntese de mediadores inflamatórios. Além disso, foi observado que a lidocaína pode sinalizar para uma maior migração de neutrófilos, considerados as células mais relevantes nos estágios iniciais da inflamação, por apresentarem características fagocitárias e atuarem na redução do edema, através da diminuição da permeabilidade vascular local (BENLIER et al., 2012).

Entretanto, apesar das inúmeras características apresentadas, do grande interesse da área médica e das evidências documentadas sobre seu potencial como curativos biológicos (MUANGMAN et al., 2011), este recurso de tratamento ainda é pouco explorado quando se trata de lesões profundas como queimaduras de terceiro grau, e são escassas as informações sobre sua contribuição como curativo neste tipo de lesão.

A LLLT, frequentemente utilizada para o tratamento de diversas condições patológicas, por ser considerado um recurso seguro, efetivo e de baixo custo, atualmente também vem sendo investigada para atuar como recurso alternativo capaz de estimular e otimizar o processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau (KARU, 1998; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

A ação da LLLT é baseada na absorção da luz laser por fotorreceptores específicos do tecido, dos quais o mais conhecido é o citocromo c oxidase localizado no interior da mitocôndria. Após ser absorvida, mudanças físico-químicas são induzidas nestes fotorreceptores, desencadeando assim uma resposta primária advinda da aceleração da cadeia transportadora de elétrons localizada no interior da mitocôndria celular. Isto promove o aumento da produção de ATP, seguido de aumento na síntese de DNA e RNA, que atua diretamente na regulação do ciclo celular favorecendo a síntese proteica e a proliferação celular (KARU, 2010; RENNÓ et al., 2011; AVCI et al., 2013; NOVAES et al., 2014), que influenciam diretamente os processos de angiogênese (BOSSINI et al., 2009; COLOMBO et al., 2013) e de diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (MEDRADO et al., 2003;

DANTAS et al., 2011). Frente a todo este estímulo e modificação no ambiente celular, efeitos terapêuticos como diminuição do edema, diminuição da inflamação tecidual e estímulo a síntese de colágeno são observadas (EZZATI et al., 2009; KARU, 2010; RENNÓ et al., 2011; AVCI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014) e estão diretamente relacionados a aceleração e otimização do processo de cicatrização (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005; EZZATI et al., 2009; KARU, 2010; RENNÓ et al., 2011; AVCI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

A magnitude do efeito biomodulatório e fotobiorregulador atribuído a LLLT está diretamente relacionada a sua interação com o tecido biológico, e são dependentes dos parâmetros empregados, como comprimento de onda, fluência, densidade de potência, energia total, bem como da frequência de tratamentos que foi previamente estipulada e o tipo da lesão a ser tratada (AVCI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013)

Assim, torna-se evidente que para atingir os efeitos terapêuticos mencionados anteriormente, os parâmetros da LLLT devem seguir um ajuste compatível com a patologia e a profundidade do tecido a ser tratado (AVCI et al., 2013). Por exemplo, a escolha do comprimento de onda a ser utilizado (vermelho ou infravermelho) estão diretamente relacionados a profundidade de penetração da luz no tecido. Outro aspecto a ser ressaltado são os valores de fluência utilizados, pois valores entre 2 e 4 J/cm² antes considerados ideais para estimular o processo de cicatrização de feridas (MEDRADO et al., 2003; MESTER, 2013; NOVAES et al., 2014), atualmente são contraditórios, já que os trabalhos científicos recentes mostram que valores próximos a 20 J/cm² induzem estímulos positivos nas fases de inflamação e proliferação promovendo melhores resultados frente ao número de vasos e ativação da microcirculação local (CORAZZA et al., 2007; MEIRELES et al., 2008; BOSSINI et al., 2009; RENNÓ et al., 2011).

Os protocolos da LLLT empregados em queimaduras de terceiro grau exemplificam tais divergências nos valores de fluência aplicados, com semelhança nos resultados encontrados referentes a cicatrização, o que dificulta o entendimento do mecanismo de ação envolvido neste tipo de lesão. Fiório et al. (2014) e Núñez et al. (2013) avaliaram os efeitos da LLLT com valores de fluência entre 1-4 J/cm² em queimaduras de terceiro grau em ratos. Ambos os autores relataram obter resultados positivos em relação à síntese de fibras de colágeno e estímulo à fase inflamatória. Porém, Núñez et al. (2013) relatam que no período experimental de dez dias foram observadas ulcerações teciduais que indicam atraso no processo de contração das bordas da ferida e epitelização tecidual. Em contrapartida, Meirelles et al. (2008), avaliaram em um mesmo modelo experimental os efeitos da LLLT com fluência de 20J/cm². Os autores também observaram resultados positivos na inflamação, qualidade e quantidade de tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e deposição e organização do colágeno, e relataram uma boa evolução do processo de cicatrização tecidual e epitelização.

Devido a divergência de parâmetros apresentados na literatura que são utilizados para a mesma finalidade, é pertinente ressaltar a necessidade de futuras investigações que proporcionem um entendimento mais específico do mecanismo de ação da LLLT, bem como do melhor parâmetro a ser empregado no caso de protocolos de tratamentos destinados a queimaduras de terceiro grau. Além disso, o conhecimento obtido em modelos experimentais poderá contribuir para a futura transposição deste método de tratamento para aplicações em humanos.

Portanto, nota-se que tanto os biomateriais quanto a LLLT vêm surgindo como alternativas de tratamentos promissoras em auxiliar o processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau. Um ponto importante a ser ressaltado é que as membranas de celulose bacteriana (BIOCEL), são produtos brasileiros com custo acessível, e que podem em um futuro próximo estar dentre os tratamentos e intervenções utilizadas nos grandes Centros de

Queimados. De forma similar, a LLLT, também demonstra grande potencial pró-inflamatório com estímulo à formação do tecido de granulação, uma vez que apresenta-se como método não invasivo e de custo relativamente baixo.

Contudo, as evidências na literatura do uso das membranas de celulose bacteriana como curativos biológicos são escassas e somente avaliadas em lesões de segundo grau. No caso dos estudos destinados à investigação da LLLT, apesar de serem avaliados em queimaduras de terceiro grau, há divergência nos parâmetros utilizados principalmente nos valores de fluência e energia total utilizados. Dessa forma, este estudo foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos das membranas de celulose bacteriana pura e acrescida de lidocaína, bem como da LLLT, utilizados isoladamente e de forma associada no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL:

Avaliar a eficácia das membranas de celulose bacteriana (BIOCEL) na sua forma pura e enriquecida com lidocaína e investigar o melhor protocolo de tratamento ideal da LLLT de forma isolada e associada em queimaduras de terceiro grau em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- (I) Avaliar a contribuição das membranas de celulose bacteriana (BIOCEL) no processo de cicatrização, através das análises histopatológica e imunohistoquímica ciclooxygenase-2 (COX-2).

- (II) Avaliar através das análises histopatológica e imunohistoquímica (COX-2) se a lidocaína presente em uma das membranas testadas, prejudica a evolução do processo de cicatrização quando comparado à membrana de celulose bacteriana pura.
- (III) Avaliar os efeitos da LLLT, estabelecidos em dois protocolos diferentes, no processo de cicatrização em queimaduras através das análises histológica e imunohistoquímica (COX-2 e VEGF).
- (IV) Avaliar a ação associada da membrana de celulose bacteriana pura e da LLLT na otimização do processo de cicatrização através das análises histológica e imunohistoquímica (COX-2 e VEGF).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo, foram utilizados 60 ratos machos *Wistar* (12 semanas de idade, \pm 280 g). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais, com 10 animais cada, grupo controle (GC): submetidos à queimadura, sem nenhum tratamento; grupo membrana (GM): submetidos à queimadura e tratados com membrana de celulose bacteriana pura; grupo membrana lidocaína (GML): submetidos à queimadura e tratados com membrana de celulose bacteriana enriquecida com de lidocaína 4%; grupo *laser* 12,5J/cm² (GL12,5): submetidos à queimadura e tratados com LLLT, 12,5 J/cm² e 0,5J de energia por ponto, totalizando 2,5 J; grupo *laser* 25 J/cm² (GL25): submetidos à queimadura e tratados com LLLT, 25 J/cm² e 1J de energia por ponto, totalizando 5J e grupo membrana de celulose bacteriana pura e *laser* 25 J/cm² (GM+L): submetidos à queimadura, tratados com membranas de celulose bacteriana pura e LLLT, 25 J/cm² e 1J de energia por ponto, totalizando 5J.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada (19-23 °C), ciclo de claro-escuro (12-12 horas) e com livre acesso à comida e à água. Todo o estudo foi realizado de acordo com o manual de cuidados e uso de animais em laboratório e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, nº022/2013 (ANEXO A).

3.2 Procedimento da Queimadura

Para o procedimento da queimadura, os animais foram anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) intraperitonealmente e posteriormente tricotomizados. O aparelho indutor do calor foi um ferro de solda que possuía em sua extremidade uma placa de alumínio de 1 cm² (KIMURA et al., 2006; KO et al., 2013; BUSUIOC et al., 2013). A temperatura foi controlada através de um termostato, com temperatura estabelecida de 150 °C, mensurada antes de cada indução de lesão. A placa devidamente aquecida foi mantida pressionada na região dorsal de cada animal por 10 segundos, produzindo assim a lesão de queimadura classificada como de terceiro grau (CAMPELO, et al., 2011; KO et al., 2013). (Figura 1).

Cabe ressaltar que os parâmetros foram estabelecidos em um estudo piloto previamente realizado, no qual foi diagnosticado por uma patologista experiente, que a temperatura de 150° C e o tempo de 10 segundos em contato com a pele do animal, promoveram a lesão de terceiro grau (ANEXO B).

Posteriormente ao procedimento os animais receberam 6,2 mg/Kg⁻¹ de dipirona sódica e, em seguida, o tratamento proposto para cada grupo. O período de tratamento estabelecido foi de dez dias, e teve início imediatamente após ao momento da indução da lesão.

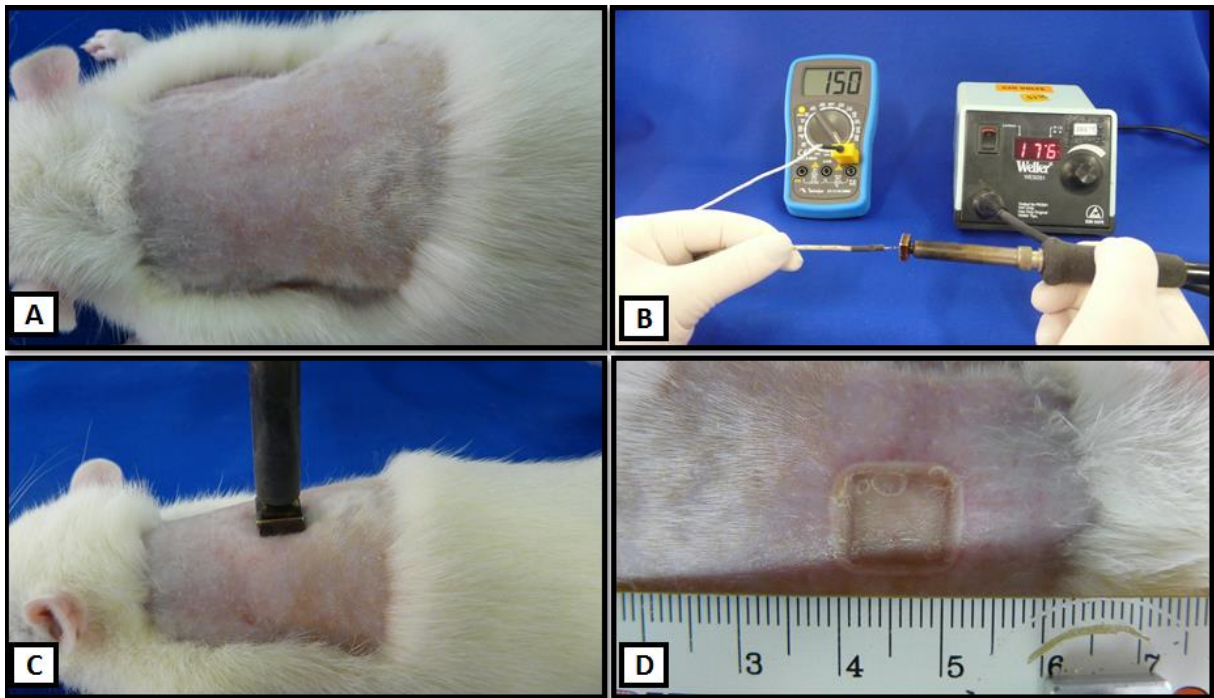


Figura 1.- Procedimento da lesão de queimadura. (A) tricotomia digital; (B) equipamento de ferro de solda com a placa de alumínio de 1 cm² acoplada a sua extremidade e termostato demonstrando a temperatura de 150 ° C; (C) placa de alumínio pressionada no dorso do animal por 10 segundos; (D) extensão da área queimada de 1 cm².

3.3 Delineamento Experimental

Os ratos utilizados neste estudo foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

Grupo Controle (GC): Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e não receberam nenhum tipo de tratamento.

Grupo Membrana de celulose bacteriana pura (GM): Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e receberam a aplicação das membranas de celulose bacteriana.

Grupo Membrana de celulose bacteriana enriquecida com lidocaína 4% (GML):

Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e receberam a aplicação das membranas de celulose bacteriana contendo lidocaína 4%.

Grupo Laser 12.5 J/cm² (GL12.5): Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e foram tratados com LLLT (660 nm), com fluência de 12.5 J/cm², por 10 segundos, fornecendo 0.5 J de energia por ponto de aplicação, totalizando ao final do tratamento 2.5 J.

Grupo Laser 25 J/cm² (GL25): Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e foram tratados com LLLT (660 nm), com fluência de 25 J/cm², por 10 segundos, fornecendo 1J de energia por ponto de aplicação, totalizando ao final do tratamento 5 J.

Grupo Membranas de celulose bacteriana pura + laser 25 J/cm² (GM+L): Os animais deste grupo foram submetidos à queimadura e receberam a aplicação da membrana de celulose bacteriana associada ao tratamento com a LLLT (660 nm), com fluência de 25 J/cm², por 10 segundos, fornecendo 1J de energia por ponto de aplicação, totalizando ao final do tratamento 5 J.

4. TRATAMENTOS

4.1 Membranas de Celulose Bacteriana

As membranas de celulose bacteriana (BIOCEL) foram cedidas pela DMC Equipamentos – Ltda., São Carlos/SP, Brasil. Foram obtidas pelo cultivo de cepas de bactéria do gênero *Acetobacter xilynum* em meios apropriados de cultura que favorecem a formação das nanofibras de celulose, obtendo como produto final uma membrana altamente hidratada. Após a obtenção da membrana pura, as membranas foram tratadas e clareadas. Para conseguir sua

variável acrescida de lidocaína, esta membrana, ainda em seu estado úmido, passou por um processo de deposição, no qual foram submetidas a uma aspersão controlada de 20 ml de solução aquosa contendo 4% de lidocaína. Ao término do procedimento as membranas foram mantidas em estufa a 80° C para o processo de secagem. Figura 2.

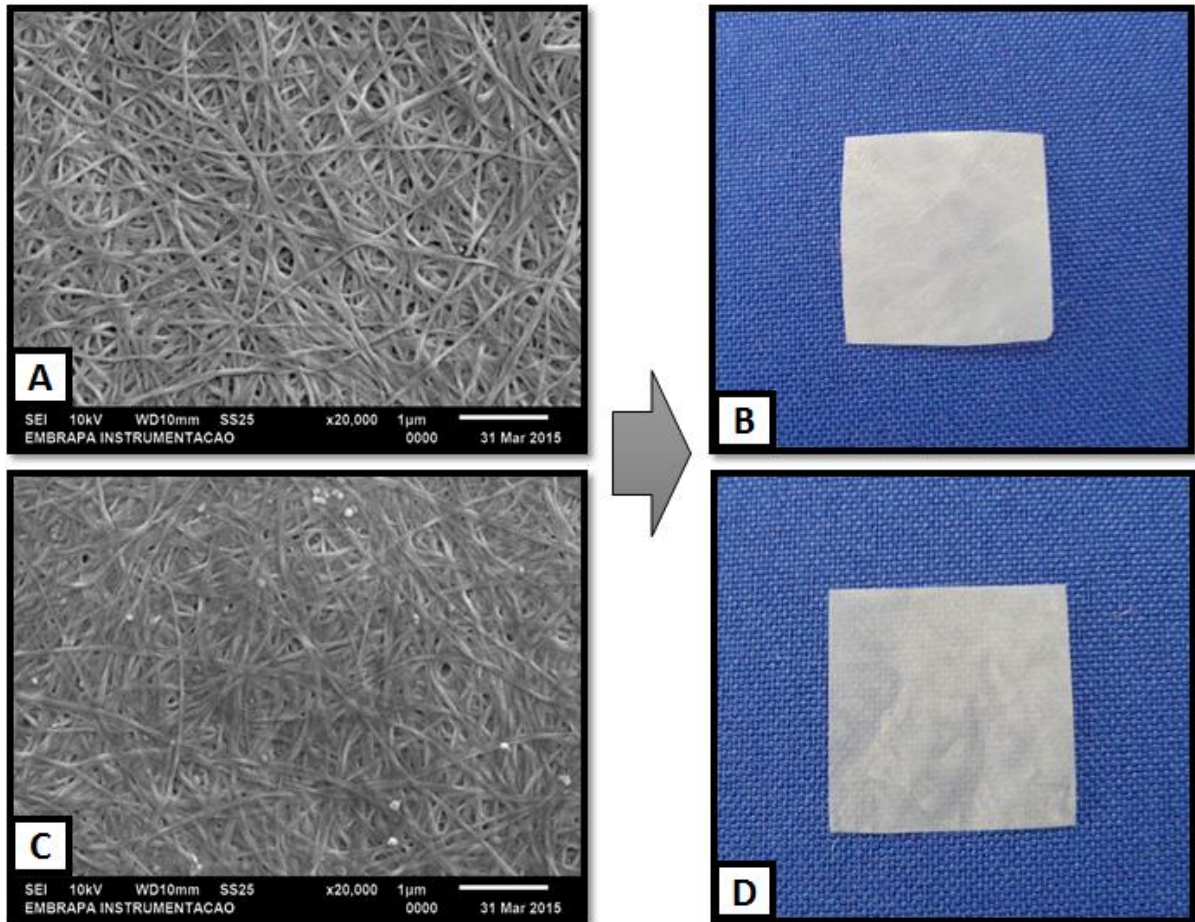


Figura 2. – Membranas de celulose bacteriana pura e acrescida com lidocaína. (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, 20x) da membrana de celulose bacteriana pura, demonstrando as nanofibras e a formação da sua estrutura macromolecular; (B) Membrana de celulose bacteriana pura; (C) Microscopia eletrônica de varredura (20x) da membrana de celulose acrescida de lidocaína 4%, demonstrando as nanofibras e a formação da sua estrutura macromolecular; (D) Membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína 4%.

As membranas de celulose bacteriana foram aplicadas sobre a lesão de queimadura, recobrimo toda a extensão da lesão. O procedimento foi realizado imediatamente após a indução da lesão, e mantidas ao longo do período experimental avaliado (Figura 3.).

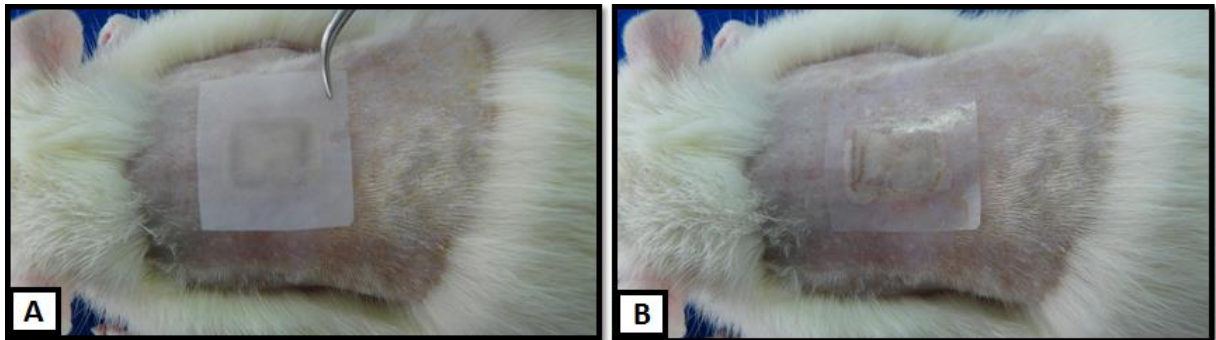


Figura 3. – Foto ilustrativa demonstrando a aplicação da membrana de celulose bacteriana na região da queimadura. (A) Aplicação da membrana de celulose bacteriana. (B) demonstração da aderência da membrana de celulose bacteriana sobre a região da queimadura.

4.2 Terapia *laser* de baixa intensidade

O equipamento da radiação *laser* utilizado foi o modelo portátil Therapy XT (DMC-São Carlos, SP, Brasil, classe B, comprimento de onda 660 nm, emissão contínua, potência de 50 mW e 100 mW, fluência de 12.5 J/cm² e 25 J/cm² e diâmetro do feixe 0,04 cm. O equipamento estava devidamente calibrado e certificado pela empresa DMC-Importação e Exportação de Equipamentos Ltda.

A aplicação do laser foi realizada em cinco pontos distintos na região da lesão, dos quais quatro estavam localizados nas bordas da ferida e um localizado na região central. Para a aplicação foi utilizada a técnica pontual em contato, com a caneta posicionada perpendicularmente ao tecido (Figura 4). Todas as aplicações foram realizadas com um intervalo de 48 horas entre elas, pelo mesmo terapeuta em um mesmo horário estipulado.

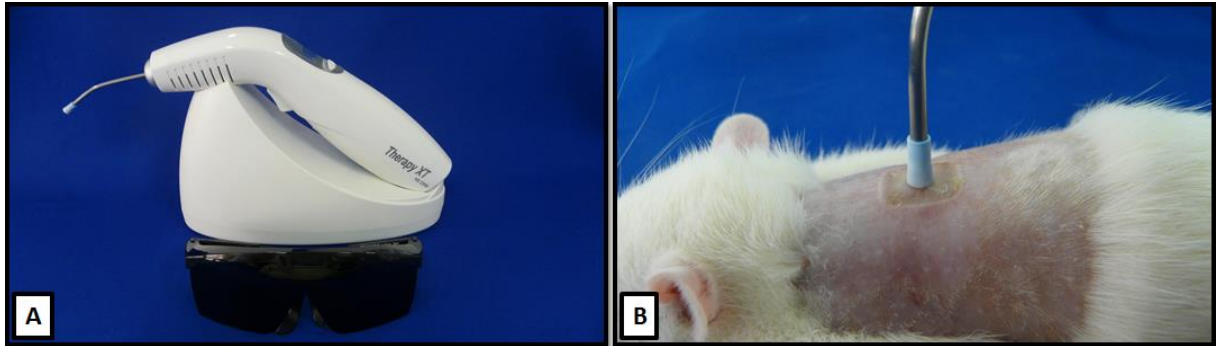


Figura 4. - Tratamento com a Terapia *laser* de baixa intensidade: (A) equipamento emissor da radiação laser; (B) imagem representativa da aplicação da irradiação na queimadura, demonstrando apenas o ponto central da região da lesão.

4.3 Eutanásia

No décimo dia do período experimental após a realização da lesão de queimadura, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico (Ketamina/Xilazina) injetado por via intraperitoneal.

4.4 Coleta das Amostras

Após a eutanásia a região total da queimadura foi retirada e encaminhada para o processamento e confecção das lâminas que foram analisadas posteriormente.

4.5 ANÁLISES

4.5.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e acrescidas de lidocaína 4% foram caracterizadas quanto a sua estrutura, por meio da espectroscopia de infravermelho (FTIR), que permite analisar as interações e ligações moleculares presentes na amostra, conforme previamente descrito por Trovatti, et al. (2011).

Para tal, foi utilizado um espectro de Infravermelho (Espectrometro Perkin-Elmer), contendo uma simples célula de diamante localizada em uma estrutura horizontal em reflectância total atenuada do inglês *Attenuated Total Reflectance* (ATR). Foram obtidos 32 ciclos entre $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ com uma resolução de 4 cm^{-1} . Para a realização da análise, as membranas foram dobradas e colocadas paralelamente em relação a célula do equipamento, e posteriormente pressionadas com um dispositivo de metal localizado na vertical, de forma a obter um contato ideal entre a amostra e a célula do equipamento. Assim, o escâner foi ligado para a realização do espectro, e o resultado das amostras foi apresentado em um gráfico obtido em reflectância 4cm^{-1} .

4.5.2 Análise Histopatológica

Para a realização da análise histopatológica, a área total da queimadura foi retirada, fixada em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por 24 horas, e posteriormente incluída em blocos de parafina. Na sequência os blocos foram cortados em sentido transversal com espessura padronizada de $5 \mu\text{m}$ e os cortes foram montados em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck) e analisadas por um patologista cego ao tratamento, sob um microscópio de luz (ZeissAxioshop, Carl Zeiss, Rio de Janeiro Brasil, com objetiva de 40x). Na análise qualitativa as seguintes alterações foram observadas: presença de fibrose, ulcerações e infiltrado inflamatório. Após a análise qualitativa, foi realizada a quantificação do infiltrado inflamatório através de metodologia descritiva na forma de escores, onde foi determinado 1=ausente, 2=leve, 3=moderado, 4=intenso (PINTO et al., 2013).

4.5.3 Morfometria de Vasos Sanguíneos

Para a análise quantitativa de vasos sanguíneos, foram capturados três campos distintos e consecutivos com objetiva de 10x, da região da derme de cada secção histológica com auxílio de um programa de imagens Motican 5.0. Os campos foram divididos em C1 e C2; representando os campos correspondentes às bordas esquerda e direita da lesão respectivamente, e C3 correspondendo a região central. A partir disto, os vasos presentes em cada campo foram contados, determinando uma média de número de vasos por animal, que posteriormente foi utilizada para o cálculo da média de número de vasos de cada grupo experimental. Todo este cálculo foi considerado por análise estatística (BOSSINI et al., 2009; NÚÑEZ et al., 2013).

4.5.4 Birrefringência

Secções histológicas coradas com método de picrossírius- red foram analisadas em um microscópio de luz polarizada, para avaliar e quantificar a deposição de fibras de colágeno na região da derme. A análise do colágeno é baseada em suas propriedades birrefringentes, de forma que as fibras de colágeno do tipo I aparecem em coloração laranja ou vermelha (DANTAS et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013). Para isso, três campos consecutivos localizados na região central de cada amostra, foram fotografados com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada em um aumento de 200x (COLOMBO et al., 2013). Para o cálculo foi utilizado o programa Image J, que fornece em “pixels” a porcentagem de fibras de colágeno por área, e depois foi então calculada a média de cada grupo estudado

(NÚÑEZ et al., 2013). Todas as análises foram realizadas em estudo cego por patologista experiente.

4.5.5 Análise Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica, cortes histológicos dos espécimes (4 µm de espessura) foram coletados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material biológico estudado. Anteriormente a realização das análises, as lâminas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37 °C, e em seguida, foi realizada a desparafinização e hidratação das secções histológicas em banhos específicos. Em seguida, os cortes foram demarcados com caneta hidrofóbica e lavados em solução tampão com Tween duas vezes por três minutos cada lavagem. Posteriormente, foi deixado por 10 minutos em solução de bloqueio da peroxidase endógena, lavado em solução tampão por duas vezes, seguido de 20 min em solução de bloqueio da reação do peróxido de hidrogênio. As amostras foram incubadas com anticorpo policlonal primário anti-COX-2 (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:200 ou anticorpo policlonal primário anti-VEGF (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:400, no qual foram mantidos por 2 horas, seguidos de dois banhos de solução tampão por 3 minutos. Seguindo o procedimento, as amostras foram submetidas ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vetor Laboratórios) em concentração de 1:200 em PBS por 30 minutos. Logo após, as amostras foram lavadas em PBS por duas vezes para a aplicação do complexo avidina biotina conjugada com peroxidase (Vetor Laboratórios) que foi mantido por 30 minutos. A visualização dos complexos ligados foi realizada com aplicação de 0,05% de solução de 3'3 diaminobenzidine e o contraste foi dado pela hematoxilina de Harris (Vetor Laboratórios) (RENNÓ et al., 2011)

A imunexpressão da COX-2 e do VEGF foi avaliada de forma qualitativa indicando a presença de imunomarcção e também de forma semi-quantitativa através da captura de três campos consecutivos, utilizando para isto um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). De acordo com estudos anteriores, foi utilizada para a análise semi-quantitativa uma escala por score de 1-4 (1=ausente; 2=leve, 3=moderado e 4=intenso) (PINTO et al., 2013). Toda a análise foi realizada por patologista experiente em estudo cego.

4.6 Análise Estatística

Para as análises de comparação entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância one-way, complementada posteriormente com o teste de Tukey para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa Statistica versão 7.0 (sistema de Software-Soft Inc.), e os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

PARTE II

5. ESTUDO I

“Membranas de celulose bacteriana aplicadas como curativos biológicos em queimaduras de terceiro grau em ratos.”

Submetido ao periódico: Journal of Tissue Viability

6. Estudo II

“Comparação de duas diferentes doses da LLLT no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos.”

Submetido ao periódico: Microscopy Research and Techniques

7. Estudo III

“Efeitos da associação de membranas de celulose bacteriana e do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos.”

Submetido ao periódico: Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials

5. ESTUDO I

MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA APLICADAS COMO CURATIVOS BIOLÓGICOS NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS.

Patricia Brassolatti¹, Hueliton Wilian Kido¹, Paulo Gabbai-Armelin¹, Paulo Sérgio Bossini^{1,2}, Luciana Almeida-Lopes², Lisinéia Maria Zanardi², Marcos Aurélio Napolitano^{2,3}, Lucimar Retto da Silva de Avó⁴, Silviane Zanni Hubinger⁵, Lucimara Aparecida Forato⁵, Fernando M. Araújo-Moreira⁶, Nivaldo Antonio Parizotto¹.

¹Departamento de Fisioterapia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

²DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil.

³Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

⁴Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

⁵Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.

⁶Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

5.1 Resumo

As lesões por queimaduras apresentam mundialmente alto risco de morbidade e mortalidade. O processo de cicatrização é considerado complexo e necessita da participação de diversas linhagens celulares. Para inovar os tratamentos existentes, proporcionando um ambiente favorável para a migração celular, novos biomateriais estão sendo investigados. O objetivo do presente estudo foi investigar o uso de biomateriais a base de celulose bacteriana em seu estado puro e também acrescido de lidocaína, em queimaduras de terceiro grau em ratos. Para isso, foram utilizados trinta animais, divididos em três grupos. Os animais sofreram a indução da queimadura através de um ferro de solda aquecido a 150°C e posteriormente pressionado no dorso do animal por 10 segundos. O tratamento foi realizado imediatamente após a indução da ferida, e as amostras de pele foram coletadas no décimo dia do período experimental. Os resultados mostraram diferenças em relação a diminuição do infiltrado inflamatório e diminuição da expressão da COX-2 apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle. Com isso pudemos constatar que houve diferenças em relação à fase do processo de cicatrização apresentada por cada grupo experimental, evidenciando um atraso no grupo controle com presença de fibrose. Os grupos tratados com membranas de celulose bacteriana pura e acrescida de lidocaína apresentaram tecido reparado, com formação de anexos da pele, e melhor organização das fibras de colágeno, o que não foi observado no grupo controle. Com isso, foi possível concluir que os biomateriais analisados proporcionaram um ambiente satisfatório para o leito da ferida auxiliando o processo de migração celular necessário para o completo fechamento da lesão.

Palavras-Chave: Celulose bacteriana, queimaduras, biomaterial.

5.2 INTRODUÇÃO

As lesões por queimaduras são consideradas mundialmente como um dos principais problemas de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, este tipo de lesão apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, levando a aproximadamente 195.000 casos de óbito ao ano.

As queimaduras ocorrem devido à exposição do tecido a agentes químicos, físicos ou biológicos, e sua gravidade está relacionada ao agente agressor, à extensão e profundidade da área atingida (KNABL et al., 1999; PESSOLATO et al., 2011).

São classificadas como lesão epidérmica, quando o acometimento atinge apenas a epiderme; lesão de espessura parcial superficial, quando apresenta bolha epidérmica e dor severa; lesão de espessura profunda, quando há grande prejuízo dérmico; e lesão de espessura total, considerada severa com perda total das camadas constituintes (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2010; TIWARI, 2012).

O processo de cicatrização é considerado um processo complexo que requer a colaboração de várias linhagens celulares (SUN et al., 2011) e é dividido em três fases fundamentais e sobrepostas, como inflamação, proliferação e remodelamento (SCWACHA et al., 2010; SUN et al., 2011). Em lesões profundas, o restabelecimento do tecido e de sua função encontra diversos desafios que podem resultar em uma deposição inadequada ou exacerbada de fibras de colágeno, o que prejudica a mobilidade e inervação local e ocasiona sensibilidade e dor (SOTO-PANTOJA et al., 2014; ARGINOVA; HADJISKI; VICTOROVA, 2006). Devido à alta incidência de casos, novos métodos e abordagens vêm sendo investigadas na intenção de inovar os tratamentos existentes e auxiliar o processo de cicatrização, tornando-o mais rápido e eficaz (BAXTER et al., 2013).

Os biomateriais naturais ou sintéticos, que tem como finalidade melhorar a funcionalidade de órgãos ou tecidos (LABUS; KAWECKI; NOWAK, 2012; MAIA et al., 2010), estão sendo extensivamente investigados para aplicações biomédicas (CZAJA et al., 2007; CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009; FU; ZHANG; YANG, 2013; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; ALMEIDA et al., 2014). Dentre os biomateriais naturais, os considerados biopolímeros, como a celulose, vêm despertando grande interesse científico.

A celulose bacteriana é um polissacarídeo extracelular produzido em meio de cultura estático, por diversas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *agrobacter*, *Sarcina* entre outros, na forma de membranas altamente hidratadas (ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; AVILA et al., 2014). Suas características, como biocompatibilidade, pureza, cristalinidade e estabilidade, são consideradas ideais para diversas aplicações biomédicas, e por isso são indicadas como efetivos curativos naturais, ou até mesmo substitutos de pele (CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009). Além disso, sua estrutura 3 D formada através das nano fibras previamente fabricadas, resultam em uma superfície amplamente nanoporosa, com importante capacidade de permeabilidade seletiva, que contribui diretamente para a proteção do ambiente da ferida contra agentes nocivos advindos do meio externo. Outras propriedades peculiares como, hidrofiliçidade, resistência e adequada aderência em superfícies irregulares do corpo, tornam este biomaterial valioso, diante das possibilidades de aplicações que englobam áreas como ciência, medicina e biotecnologia (CHENG et al., 2014). Prometem também inovar de maneira significativa a área de engenharia de tecidos, por demonstrarem resultados satisfatórios quando analisados em quadros de feridas de difícil cicatrização como úlceras e queimaduras severas (SASKA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2014).

Diante da abundância de características apresentadas, somada a sua estrutura macromolecular, as membranas também estão sendo investigadas para atuarem como sistemas precisos de entrega de drogas. Antiinflamatórios, analgésicos e anestésicos, substâncias cuja

aplicação transcutânea pode ser necessária, estão entre os medicamentos estudados (TROVATTI et al., 2011; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014). A lidocaína, por exemplo, um anestésico tópico utilizado para bloquear de forma reversível a condução de estímulos nervosos, pode ser incorporado de maneira fácil e efetiva neste tipo de membrana. A liberação do produto incorporado se dará quando ele entrar em contato com as áreas de lesão cutânea. Após a liberação, sua atuação poderá promover tanto efeito analgésico local, quanto atuar de forma intrínseca ao processo de cicatrização, inibindo a síntese de mediadores inflamatórios. Outro benefício encontrado na participação da lidocaína é sua capacidade em auxiliar a migração de neutrófilos, considerados as células mais relevantes nos estágios iniciais da inflamação, por apresentarem características fagocitárias e atuarem na redução do edema, através da diminuição da permeabilidade vascular local (BENLIER et al., 2011).

Com isso, podemos dizer que a incorporação da lidocaína na estrutura macromolecular da membrana de celulose bacteriana, poderia potencializar a absorção de exsudato presente no leito da ferida, uma vez que apresentam características hidrofílicas, e possuem assim maior capacidade de absorção e aprisionamento de moléculas de água. Esta característica pode favorecer de maneira significativa o ambiente da lesão e também todo o processo de cicatrização.

Portanto, ambos os biomateriais propostos para este estudo, membrana de celulose bacteriana pura ou acrescida de lidocaína, parecem representar abordagens terapêuticas vantajosas para tratamento de feridas profundas como queimaduras, pois além de curativo biológico que funciona como barreira protetora, favorece de forma natural a migração celular necessária e indispensável para promover a cicatrização. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da membrana de celulose bacteriana pura ou acrescida de lidocaína no tratamento de queimaduras profundas consideradas de espessura total, em ratos no décimo dia pós-operatório.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 30 ratos machos *Wistar* (12 semanas de idade, \pm 280 g) que foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, com 10 animais cada; grupo controle (GC): submetidos à queimadura, sem receber nenhum tratamento; grupo membrana (GMP): submetidos a queimadura e tratados com membrana de celulose bacteriana pura; grupo membrana lidocaína (GML): submetidos a queimadura e tratados com membranas de celulose bacterianas acrescida de lidocaína 4%. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada (19-23 °C), ciclo de claro-escuro (12-12 horas) e livre acesso a comida e a água. Todo o estudo foi realizado de acordo com o manual de cuidados e uso de animais em laboratório e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, n°022/2013.

Para o procedimento da queimadura, os animais foram anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) intraperitonealmente e posteriormente tricotomizados. A queimadura foi realizada no dorso de cada animal com uma placa de alumínio de 1 cm² acoplada a um ferro de solda (KIMURA et al., 2006; BUSUIOC et al., 2013; KO et al., 2013) com temperatura de 150° C, controlada com auxílio de um termostato e pressionada na pele do animal por 10 segundos (KO et al., 2013). Imediatamente após a lesão, os animais receberam 6.2 mg/Kg⁻¹ de dipirona sódica, e em seguida, o tratamento proposto para cada grupo. O GC não recebeu nenhum tipo de tratamento; o GM recebeu a membrana de celulose bacteriana logo após a lesão, e o GML recebeu a membrana de celulose acrescida de 4% de lidocaína logo após a lesão. Dez dias após a indução da lesão, os animais foram eutanasiados e as amostras foram coletadas para realização das análises.

5.3.1 Membranas de Celulose Bacteriana

As membranas de celulose bacteriana (BIOCEL) foram cedidas pela DMC Equipamentos – Ltda., São Carlos/SP, Brasil. Para sua obtenção, bactérias do gênero *Acetobacter xilynum* foram mantidas em meios de cultura estático, nas condições necessárias para a produção das nanofibras de celulose. O rearranjo destas nanofibras promovem a formação de membranas altamente hidratadas como produto final. Após a obtenção da membrana pura, as membranas foram tratadas e clareadas. Para conseguir sua variável acrescida de lidocaína, esta membrana, ainda em seu estado úmido, passou por um processo de deposição, no qual foi realizada uma aspersão controlada de 20 ml de solução aquosa contendo 4% de lidocaína. Ao término do procedimento, as membranas foram mantidas em estufa a 80° C, para o processo de secagem e esterilização.

5.3.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

As membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e acrescidas de lidocaína 4% foram caracterizadas quanto a sua estrutura, por meio da espectroscopia de infravermelho (FTIR), que permite analisar as interações e ligações moleculares presentes na amostra, conforme previamente descrito por Trovatti, et al. (2011).

Para tal, foi utilizado um espectro de Infravermelho (Espectrometro Perkin-Elmer), contendo uma simples célula de diamante localizada em uma estrutura horizontal em reflectância total atenuada (ATR). Foram obtidos 32 ciclos entre 4000 – 600 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} . Para a realização da análise, as membranas foram dobradas e colocadas paralelamente em relação a célula do equipamento, e posteriormente pressionadas com um

dispositivo de metal localizado na vertical, de forma a obter um contato ideal entre a amostra e a célula do equipamento. Assim, o escâner foi ligado para a realização do espectro, e o resultado das amostras foi apresentado em um gráfico obtido em reflectância 4cm^{-1} .

5.3.3 Análise Histopatológica

Após o período experimental, a área total da queimadura foi retirada para a realização das análises. As amostras foram fixadas em 10% de formalina tamponada (Merck, Darmstadt, Germany), emblocadas em parafina e cortadas em secções transversais com espessura padronizada de 5 μm . Foram então realizados três cortes de cada amostra, que posteriormente foram corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck) e analisados. A avaliação histológica foi realizada em um microscópio de luz (ZEISS Axioshop, Carl Zeiss, Rio de Janeiro Brasil, com objetiva de 40x). Foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de fibrose, ulcerações e infiltrado inflamatório. Após a análise descritiva foi realizada a quantificação do infiltrado inflamatório através de metodologia descritiva na forma de escores, onde foi determinado 1=ausente, 2=leve, 3=moderado, 4=intenso (PINTO et al., 2013).

5.3.4 Morfometria de Vasos Sanguíneos

Para a análise quantitativa de vasos sanguíneos, foram capturados três campos com objetiva de 10x, da região da derme de cada secção histológica com auxílio de um programa de imagens Motican 5.0, e a partir disto os vasos presentes em cada campo foram contados. A média do número de vasos foi considerada por análise estatística (BOSSINI et al., 2009; NÚÑEZ et al., 2013)

5.3.5 Birrefringência

Secções histológicas coradas com método de picrossírius- red foram analisadas em um microscópio de luz polarizada para avaliar e quantificar a deposição de fibras de colágeno na região da derme. A análise do colágeno é baseada em suas propriedades birrefringentes, nas quais as fibras de colágeno do tipo I aparecem em coloração laranja ou vermelha (DANTAS et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013). Para isso, três campos consecutivos localizados na região central de cada amostra, foram fotografados com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada em um aumento de 200x (COLOMBO et al., 2013). Para o cálculo foi utilizado o programa Image J, que fornece em “pixels” a porcentagem de fibras de colágeno por área, e depois foi então calculada a média de cada grupo estudado (NÚÑEZ et al., 2013). Todas as análises foram realizadas por patologista experiente (PESSOLATO et al., 2011).

5.3.6 Análise Imunohistoquímica

Cortes histológicos dos espécimes com 4 µm de espessura foram coletados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material biológico. No início do processo as lâminas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37 °C, seguida de banhos específicos de desparafinização e hidratação das secções histológicas. Os cortes foram, então, incubados em uma solução tampão de peróxido de hidrogênio, e solução tampão de fosfato (PBS) por 5 minutos para inativação da peroxidase endógena. Foi adicionado o anticorpo anti-Ciclooxigenase-2 (COX-2) (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:200, que permaneceu por duas horas e foi seguida de dois banhos com PBS. Em seguida, as amostras

foram submetidas ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vetor Laboratórios) em concentração de 1:200 em PBS, onde foram mantidas por 30 min. Após este processo as amostras foram lavadas em PBS por duas vezes e seguiram para a aplicação do complexo avidina biotina conjugada com peroxidase (Vetor Laboratórios) por 45 minutos. A visualização dos complexos ligados foi realizada com aplicação de 0,05% de solução de 3'3 diaminobenzidine e o contraste foi dado pela hematoxilina de Harris (Vetor Laboratórios) (RENNÓ et al., 2011).

A imunoexpressão da COX-2 foi avaliada de forma qualitativa onde foi observada a intensidade da imunomarcção apresentada na coloração marrom, e semi-quantitativa onde com o auxílio de um microscópio de luz (leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany), com objetiva de 10x, foram capturados três campos distintos da amostra. De acordo com estudos anteriores a determinação da análise semi-quantitativa foi realizada através do estabelecimento de uma escala por escore, considerada de 1-4 (1=ausente; 2leve, 3=moderado e 4=intenso) (PINTO et al., 2013). Toda a análise foi realizada por patologista experiente.

5.4.7 Análise Estatística

Para todas as análises de comparação entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância one-way, complementada posteriormente com o teste de Tukey. Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa Statistica versão 7.0 (sistema de Software-Soft Inc.), onde os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Foi possível diagnosticar através do espectro em reflectância as bandas características relacionadas à estrutura química da celulose e da lidocaína, presentes nas respectivas membranas GM (membrana de celulose bacteriana pura) e GML (membrana de celulose bacteriana com lidocaína). As membranas de celulose bacteriana pura apresentaram em seu espectro de infravermelho bandas características de substratos celulósicos, com bandas intensas em aproximadamente 3.300 cm^{-1} associado às vibrações OH, 2.800 cm^{-1} associado as vibrações C-H e 1.100 cm^{-1} associado as vibrações C-O-C que caracteriza, portanto, o grupo dos polissacarídeos, como demonstrado na figura 4 (MP). O espectro da membrana contendo a lidocaína 4% também mostrou os picos relacionados às ligações químicas dos substratos celulósicos e, além disso, evidenciou o pico característico relacionado à presença da lidocaína. Sendo assim os picos encontrados e que caracterizam a presença da lidocaína na membrana foram em aproximadamente 3.250 cm^{-1} associado às bandas de N-H, relacionado, portanto a amida secundária, e em 1.550 cm^{-1} relacionado ao anel aromático C=C presente na estrutura química da lidocaína, exatamente como o mostrado nos espectros de lidocaína pura analisados previamente nos estudos de Trovatti et al. (2011), além do pico em 1.100, que caracteriza a presença dos polissacarídeos, figura 5 (ML).

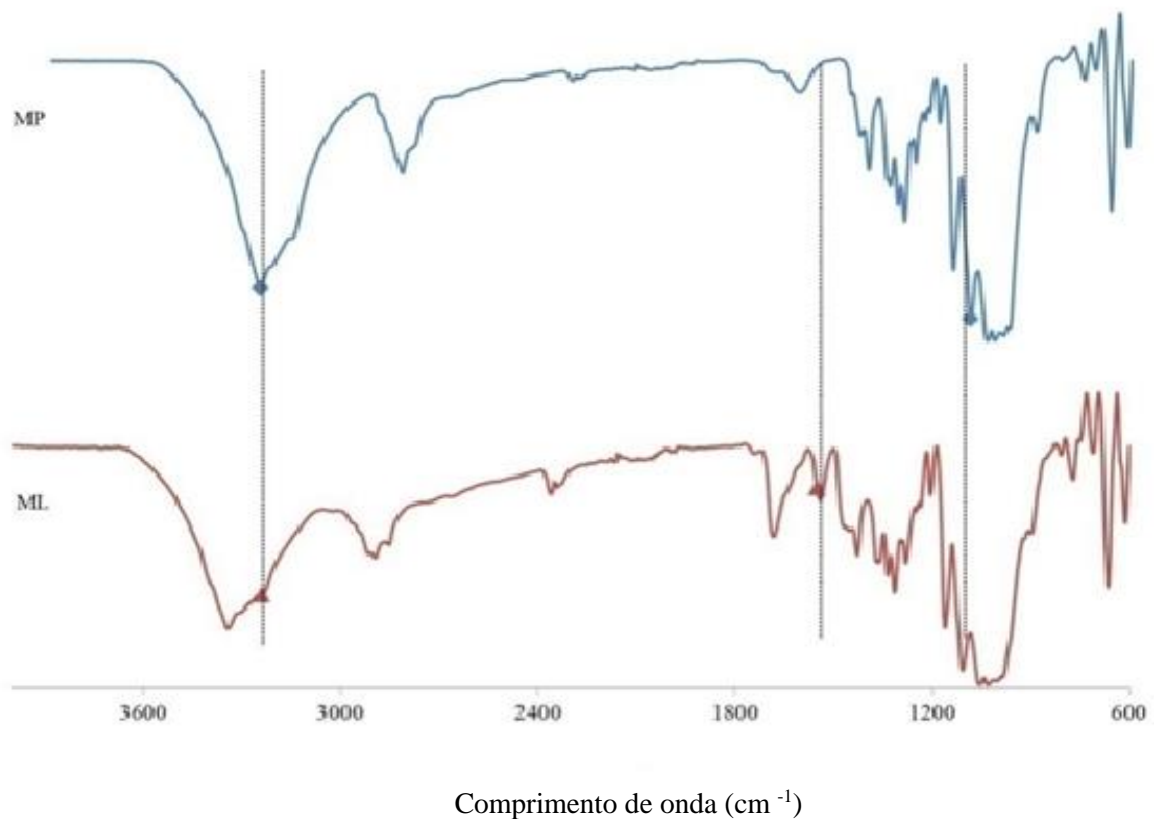


Figura 5. - Espectro de FTIR-ATR das membranas de celulose bacteriana. Espectro da membrana de celulose bacteriana pura (MP), evidenciando as bandas características em aproximadamente 3.300 cm^{-1} relacionado às vibrações de OH e em 1.100 cm^{-1} relacionado aos polissacarídeos. Espectro da membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína (ML), evidenciando suas bandas características em 3.250 cm^{-1} relacionado às ligações N-H e 1.550 cm^{-1} relacionado à ligação C=C do anel aromático da estrutura química da lidocaína em seu estado puro.

5.4.2 Análise Histopatológica

As análises histopatológicas revelaram diferenças entre os grupos tratados com as membranas de celulose bacteriana e o controle. Os grupos tratados com as membranas GM e GML não apresentaram diferenças entre si, e os biomateriais aplicados mostraram-se eficazes

em auxiliar e acelerar o processo de cicatrização, demonstrando um padrão histológico compatível com um estágio mais avançado de reparo quando comparados ao grupo controle. Nos grupos GM e GML foi possível observar características de completo reparo tecidual por apresentarem formação da epiderme, presença dos anexos da pele, organização na disposição das fibras de colágeno, além de discreto infiltrado inflamatório, discreto tecido de granulação e ausência de ulcerações e fibrose, diferentemente das características encontradas no GC, que apresentou epiderme espessa e tecido desorganizado com ausência dos anexos da pele, moderado infiltrado inflamatório, moderado tecido de granulação e intensa fibrose (Figura 6.).

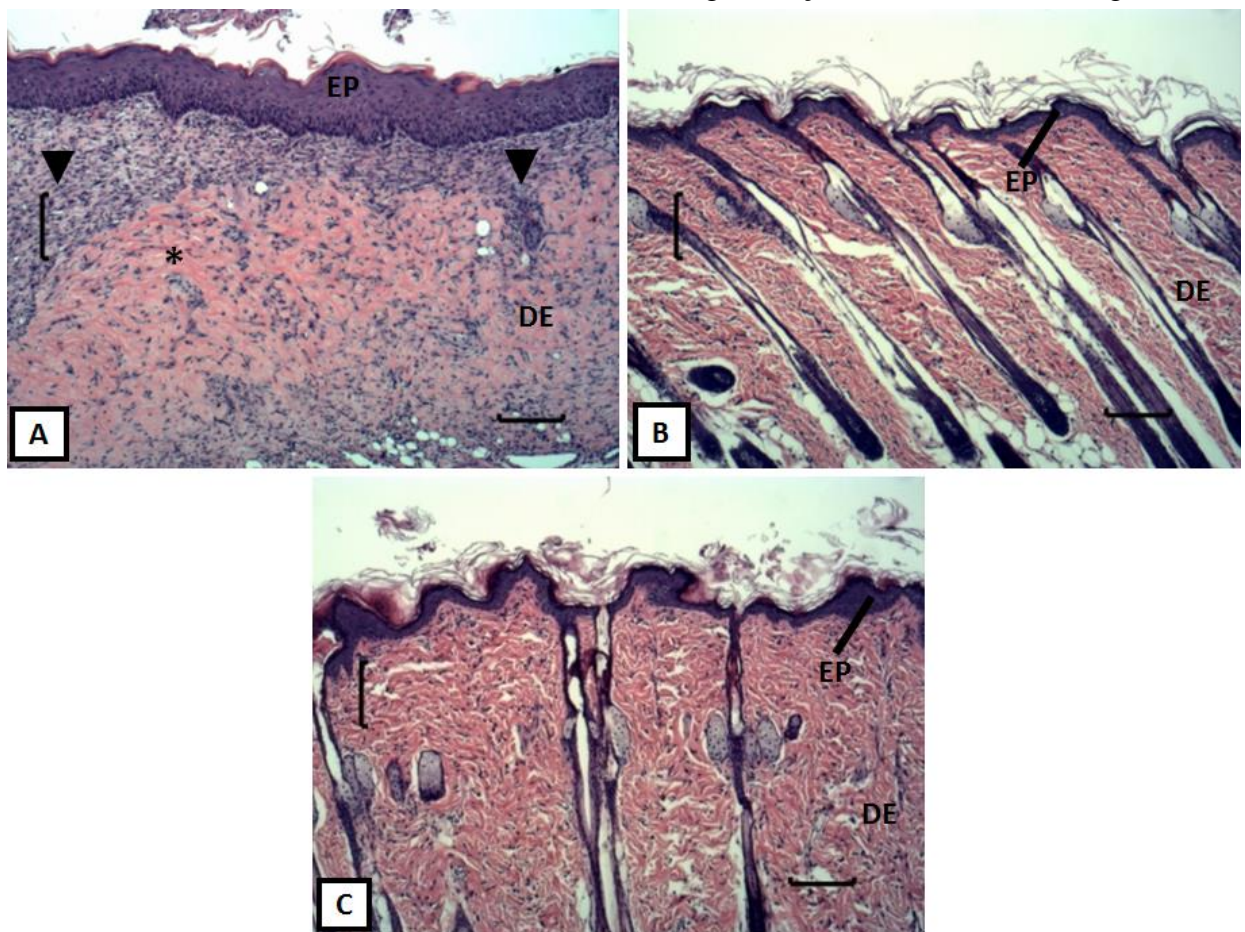


Figura 6.- Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais coradas com hematoxilina e eosina. (EP) epiderme, (DE) derme, (*) fibrose, (seta preta) anexos da pele, (▼) infiltrado inflamatório. A - grupo controle representando a pele somente com a lesão, B - grupo membrana de celulose bacteriana (GM), C - grupo membrana de celulose bacteriana com lidocaína (GML). (Coloração: HE, Barra=100µm).

Com relação ao infiltrado inflamatório, é possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle (Figura 7). O GC apresentou um infiltrado inflamatório mais intenso do que os grupos GM e GML. Entre os grupos GM e GML não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

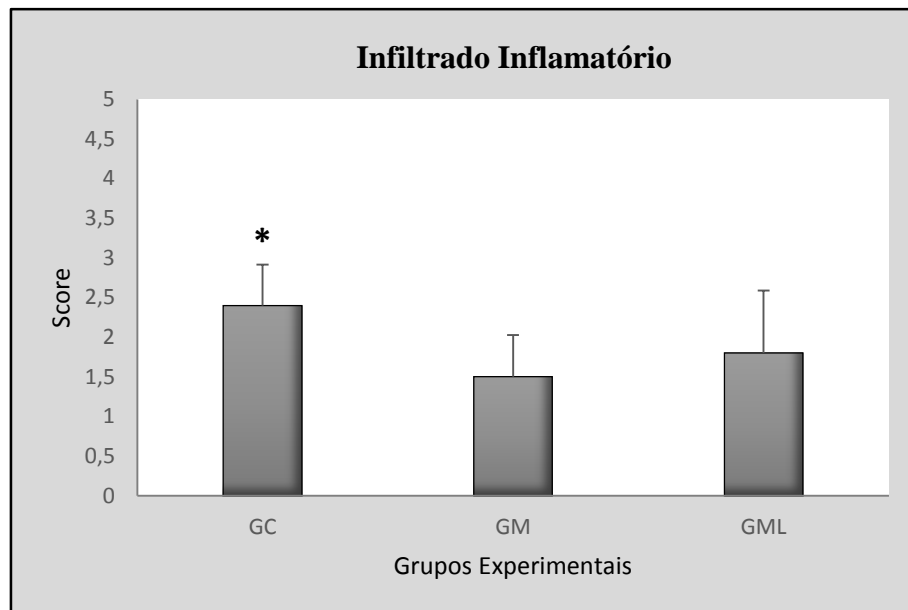


Figura 7. – Quantificação de infiltrado inflamatório. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) - grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína. * $p \leq 0,05$ versus GM e GML.

5.4.3 Morfometria de Vasos Sanguíneos

A contagem dos vasos foi realizada predominantemente na camada da derme. No período experimental estudado os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao número de vasos sanguíneos, apesar do GM e GML apresentarem um grau de cicatrização mais avançado, apresentando tecido estruturalmente organizado e reparado, diferentemente do observado no GC (Figura 8.).

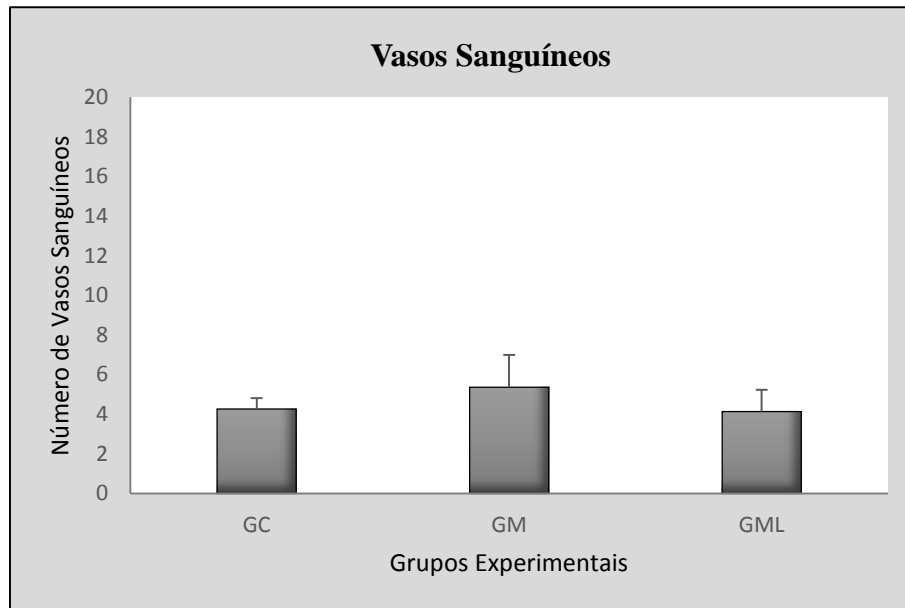


Figura 8. - Número de vasos sanguíneos. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) – grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína.

5.4.4 Birrefringência

A figura 9. mostra a porcentagem das fibras de colágeno encontradas em cada grupo experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Todos os grupos apresentaram similaridade em relação à quantidade de fibras de colágeno presente na camada da derme. Porém, os grupos tratados apresentaram a disposição das fibras de colágeno de forma mais organizada.

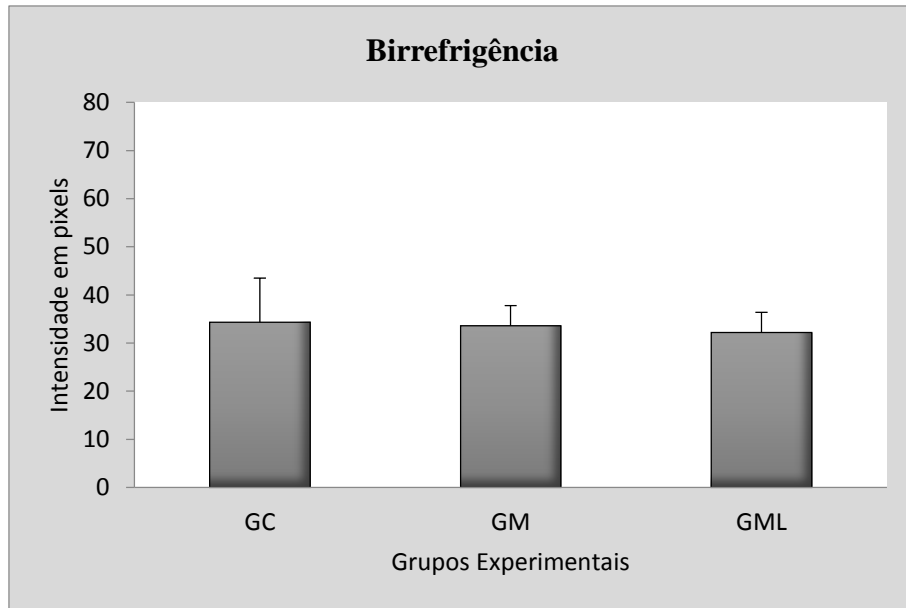


Figura 9. – Birrefringência de fibras de colágeno. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana pura; (GML) - grupo membrana com lidocaína.

5.4.5 Análise Imunohistoquímica

Foi observada a expressão da COX-2 através da marcação encontrada em coloração marrom nas células da camada da derme, localizada logo abaixo das células da epiderme. Uma maior quantidade de COX-2 foi detectada no grupo GC onde os animais foram expostos somente ao procedimento da queimadura (Figura 10-A). Os outros dois grupos GM e GML apresentam similaridade demonstrando uma discreta, quase inexistente imunomarcação da COX-2 (Figura 10-B e C). Isto evidencia que o GC realmente apresenta uma maior quantidade de células inflamatória em relação aos grupos tratados e que o processo de cicatrização, portanto encontra-se em uma etapa mais inicial, caracterizada por processo inflamatório e proliferação celular.

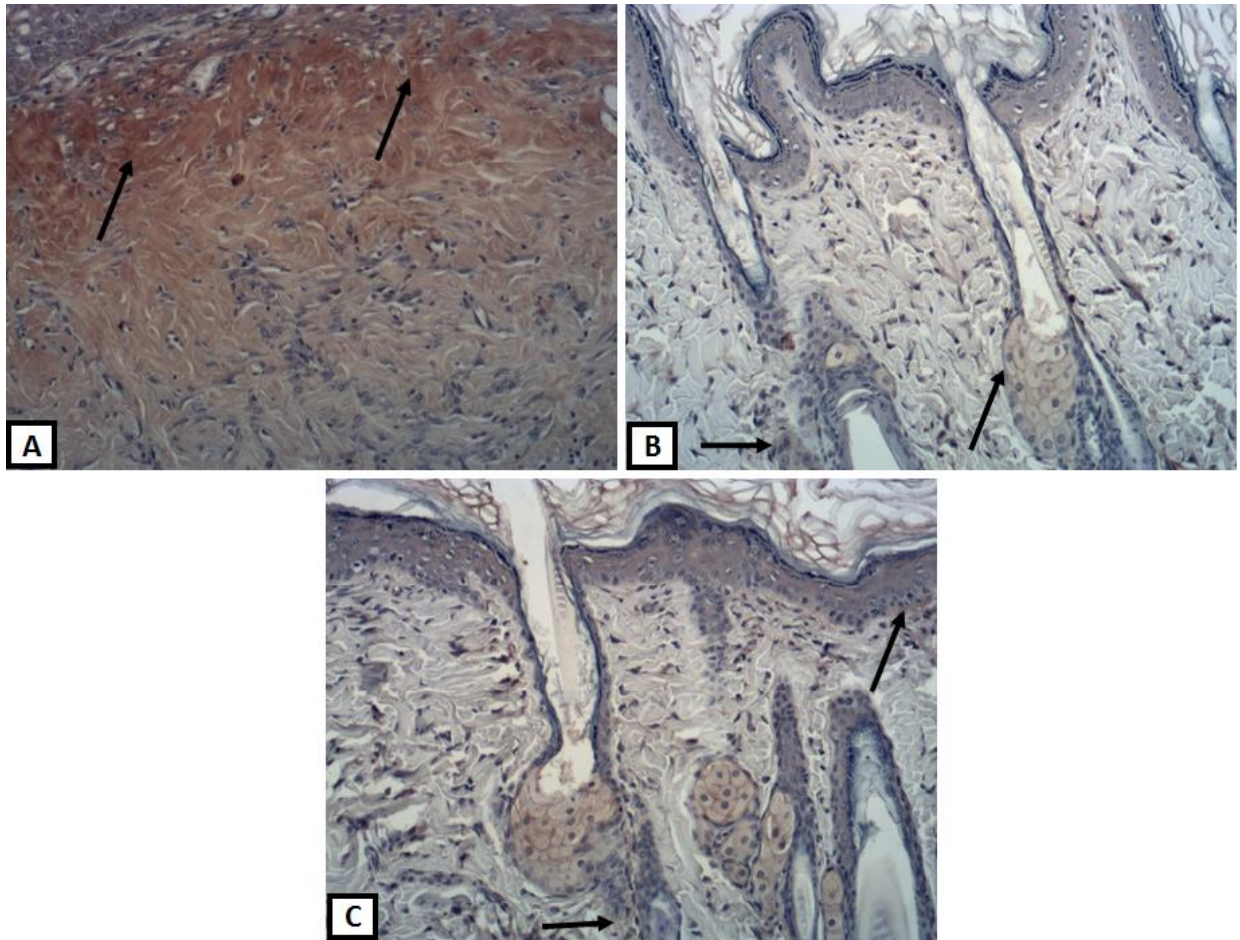


Figura 10. – Fotomicrografias representativas da imunopressão da COX-2 (setas). A- grupo controle mostrando intensa marcação representada em marrom das células da COX-2 (seta). B- grupo membrana de celulose bacteriana pura (GM) e C- grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína (GML). (Coloração: Imunohistoquímica)

A figura 11. ilustra a análise semi-quantitativa por escores. O grupo GC apresenta uma diferença estatística significativa em relação aos grupos tratados, na qual é possível observar a intensa imunomarcação da COX-2. Nos grupos GM e GML a marcação mostra resultados diferentes do GC, com uma marcação leve, quase inexistente.

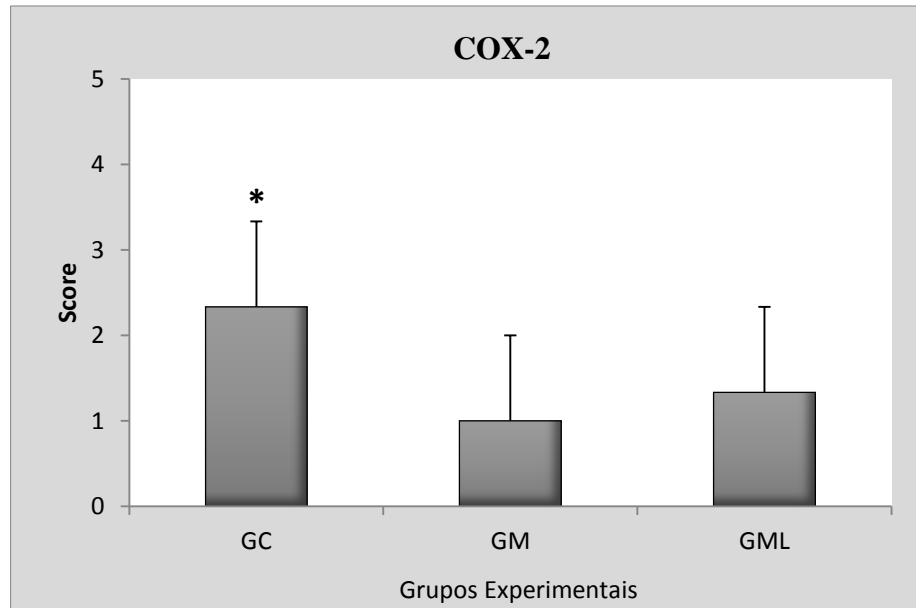


Figura 11. – Imunoexpressão da COX-2. (GC) - grupo controle, (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura e (GML) - grupo membrana de celulose bacteriana acrescida de lidocaína. * $p \leq 0,05$ versus GM e GML.

5.5. DISCUSSÃO

A busca por novos biomateriais que possam ser usados como inovações nas áreas da medicina regenerativa e engenharia de tecidos vêm crescendo nas últimas décadas. O presente estudo teve como objetivo investigar o uso de membranas de celulose bacteriana pura e também acrescida com lidocaína em casos de queimaduras de terceiro grau. As características e propriedades de biomateriais a base de celulose bacteriana já são bem descritas na literatura (CZAJA et al., 2007; FU; ZHANG; YANG, 2013; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; ALMEIDA et al., 2014), porém, apesar de serem indicados para uso em feridas crônicas e queimaduras, são escassas as informações encontradas sobre sua aplicação em queimaduras de terceiro grau. Portanto, a proposta deste estudo foi direcionada a investigar sua ação neste tipo de lesão e verificar se suas propriedades podem contribuir de maneira satisfatória para o processo de reparo tecidual.

A caracterização deste tipo de biomaterial, e a incorporação de outras substâncias em sua composição também já são encontradas na literatura. Trovatti et al. (2012) investigaram a estrutura e capacidade da incorporação de lidocaína na rede macromolecular presente na membrana de celulose bacteriana pura. Os achados corroboram os resultados encontrados em nosso estudo, que mostram tanto as bandas dos polissacarídeos que evidenciam a característica química da celulose, como também a presença da lidocaína com um pico característico em aproximadamente 1550 cm^{-1} , comprovando que há possibilidade de incorporação das moléculas de lidocaína à rede macromolecular, e que quando em contato com a área lesada, ela é liberada formando um inovador sistema de entrega de drogas.

A gravidade da queimadura de terceiro grau e a habilidade da pele em recuperar suas estruturas histológicas, está intimamente ligada à complexidade do processo de cicatrização (BUSUIOC et al., 2013). Por isso, a intenção da aplicação de biomateriais naturais para atuarem como curativo biológico é fornecer uma barreira protetora provisória contra infecções advindas de microrganismos presentes no meio externo, e ao mesmo tempo possibilitar um ambiente favorável para migração e proliferação celular necessária. Fu et al. (2012) em um estudo experimental, compararam os efeitos de diferentes tipos de tratamentos em feridas de espessura total no dorso de camundongos. Os resultados demonstraram que os biomateriais apresentaram vantagens no processo de cicatrização, apresentando melhor regeneração tecidual e diminuição da resposta inflamatória, quando comparado aos grupos tratados com enxertos e curativos convencionais. Além disso, reportaram que a estrutura macromolecular do biomaterial atuou de maneira satisfatória na proteção do leito da ferida impedindo possíveis infecções. Portal; Clark; Levinson, (2009), em estudo clínico, aplicaram um curativo a base de celulose bacteriana em úlceras de membros inferiores, e observaram que o tempo gasto para ocorrer a reepitelização da área lesada foi reduzido quando comparada ao grupo controle que utilizou tratamento convencional. Histologicamente, nossos resultados corroboram os achados

prévios. Em nosso estudo foi possível observar que os grupos tratados com membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e acrescida de lidocaína, apresentaram um estágio de cicatrização mais avançado quando comparado ao grupo controle. Os grupos tratados apresentaram, além da organização de suas camadas constituintes, epiderme e derme, também a formação de todas as estruturas histológicas, como glândulas sebáceas, folículos pilosos e pelos, o que não foi observado nas amostras do grupo controle.

A primeira fase do processo de cicatrização, a inflamação, é crucial para a evolução do reparo, por envolver, logo nos primeiros dias, citocinas e fatores de crescimento que atuam como sinais quimiotáticos induzindo a migração celular necessária, que será indispensável para as fases seguintes do processo de cicatrização (REINKE; SORG, 2012). Há evidências que o resultado desta fase está diretamente relacionado à formação de cicatrizes indesejáveis, e por isso é necessário avaliar fatores interligados como infiltrado inflamatório, COX-2 e angiogênese, que são primordiais para a boa evolução do processo de reparo tecidual (BLOMME et al., 2003; LEE et al., 2003; REINKE; SORG, 2012; BUSUIOC et al., 2013).

Em nosso estudo, foi observado que o grupo controle apresentou um infiltrado inflamatório mais intenso quando comparado aos grupos tratados com ambas as membranas, e isso pode ter contribuído para formação de fibrose e atraso do processo de cicatrização apresentado por este grupo.

Futagami et al. (2002), compararam em seu estudo as mudanças ocorridas na expressão da COX-2 em tecido sadio e após a indução da lesão de espessura total, e constataram que no tecido sadio ela apenas apresenta-se discretamente expressa na base dos folículos pilosos e glândulas sebáceas, enquanto que no processo de cicatrização do tecido lesado sua expressão geralmente é intensa, localizada na camada basal da epiderme e nas bordas da ferida, predominando entre o 1° e 7° dia após a lesão.

A presença da enzima COX-2 está relacionada a cascata do ácido araquidônico que tem como produto final a produção de prostaglandinas e tromboxanos, que juntamente com as citocinas e fatores de crescimento, estão ligados ao processo de migração celular (GOLDYNE, 2000; FUTAGAMI et al., 2002; LEE et al., 2003). Porém, quando presente em estágios tardios de cicatrização e em abundância no tecido, como observado em nosso grupo controle, podem estar relacionadas a formação de fibrose ou até mesmo possíveis falhas relacionadas ao fechamento das bordas da ferida (FUTAGAMI et al., 2002). No nosso modelo experimental, observamos que no décimo dia de tratamento com as membranas, a expressão da COX-2 já se apresentava nos níveis próximos à normalidade, estando portanto, localizadas apenas nas bases dos folículos pilosos, igualmente aos encontrados em tecido sadio. Isto demonstra que este tipo de membrana contribuiu de maneira positiva, favorecendo o ambiente para a proliferação celular, acelerando o processo de reparo do tecido quando comparado ao apresentado no estudo de Blomme et al. (2003), que observaram esta normalidade apenas depois do décimo quarto dia de tratamento.

Quanto à angiogênese os grupos apresentaram similaridade na quantidade de vasos presentes na derme, não sendo encontrada, portanto nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, e nem mesmo características que sugerissem que este resultado pudesse estar correlacionado a quantidade de COX-2 no tecido como descrito previamente por Futagami et al. (2002).

Na avaliação da porcentagem de fibras de colágeno não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, apesar dos grupos tratados com as membranas apresentarem um grau mais elevado em termos de organização na disposição das fibras. A síntese de colágeno é um processo essencial para o reparo de queimaduras, porém quando seus níveis se apresentam elevados são prejudiciais para o resultado final, pois facilitam a formação de fibrose devido a uma excessiva formação de matriz extracelular rica em

fibroblastos. Portanto, o desequilíbrio desta síntese ou mesmo a ausência destas fibras no tecido comprometem o reparo do tecido, ocasionando resultados não satisfatórios (PESSOLATO et al., 2011). Embora existam evidências na literatura de uma possível ação negativa da lidocaína na síntese do colágeno, nenhuma característica negativa em relação a isso foi encontrada em nosso estudo, pelo contrário, a presença de lidocaína não prejudicou nenhuma etapa da evolução do processo de cicatrização. Benlier et al. (2012) investigaram os efeitos da aplicação intravenosa da lidocaína em quadros de queimaduras por danos elétricos e encontraram que sua ação foi capaz de reduzir o quadro de edema, com diminuição do risco de necrose no tecido. Diante disso, podemos concluir que algumas características estruturais da lidocaína como, por exemplo, sua hidrofiliabilidade contribui na absorção do exsudato, e possivelmente este fato auxilia a redução do edema, bem como a rápida resolução do quadro inflamatório acelerando o processo de reparo.

Dentre as análises realizadas neste trabalho, as que apresentaram diferenças significativas como infiltrado inflamatório e COX-2 discutidas previamente, são determinantes para a indicação deste tipo de produto como curativo biológico efetivo nos casos de lesão por queimaduras térmicas.

Portanto, diante dos resultados apresentados, concluímos que o biomaterial estudado mostrou-se compatível para o uso em queimaduras de terceiro grau, apresentando boas vantagens no auxílio da migração e proliferação celular necessárias para a conclusão do processo de cicatrização. Além disso, suas propriedades peculiares como estrutura macromolecular e permeabilidade seletiva estão intimamente ligadas aos bons resultados encontrados, pois conseguem proporcionar, no leito da ferida, um ambiente ideal para que ocorra o reparo de maneira íntegra. Com isso, podemos concluir que este biomaterial apresenta potenciais clínicos para aplicações em queimaduras de terceiro grau, por atuarem como

cobertura ideal diminuindo os riscos de infecções decorrentes do meio externo e por proporcionar um ambiente ideal capaz de acelerar o processo de cicatrização como um todo.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEER, M. M.; AMIN, M. C. I. M.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047-1061, 2014.

ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332-336, 2014.

AVILA, H. M.; SCHWARZ, S.; FELDMANN, E-V.; MANTAS, A.; BOMHARD, A. V.; GATENHOLM, P.; ROTTER, N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7423-7435, 2014.

BAXTER, R. M.; TIANHONG, D.; KIMBALL, J.; WNG, E.; HAMBLIN, M. R.; WIESMANN, W. P.; McCrthy, S. J.; BAKER, S. M. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 2, p. 340-348, 2013.

BENLIER, E.; ESKIOCAK, S.; PUYAN, F. O.; SIKAR, E. Y.; KANDULU, H.; OMURLU, I. K.; TOP, H.; AYGIT, A. C. Effects of lidocaine on reduction injury in a rat electrical burn model. *Annals of plastic surgery*, v.69, n.2, 2012.

BLOMME, E. A. G.; CHINN, K. S.; HARDY, M. M.; CASLER, J. J.; KIM, S. H.; OPSAHL, A. C.; HALL, W. A.; TRAJKOVIC, D.; KLAN, K. N.; TRIPP, C. S. Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *British Journal of Dermatology*, 148: 211-223, 2003.

BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R. M.; RENNÓ, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 209-213, 2009.

Busiousc

CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. **J Biol Eng**, v. 3, p. 12, 2009.

COLOMBO, F.; VALENÇA NETO, A. A. P.; SOUSA, A. P. C.; MARCHIONNI, A. M. T.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on

Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308-312, 2013-07, 2013.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROW, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAÚJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 1, p. 51-59, 2011.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

FUTAGAMI, A.; ISHIZAKI, M.; FUKUDA, Y.; KAWANA, S.; YAMANAKA, N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 11, p. 1503-1513, 2002.

GARAVELLO-FRELTAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; da CRUZ-HOFLING, M. A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 70, n. 2, p. 81-89, 2003.

GOLDYNE, M. E. Cyclooxygenase isoforms in human skin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 63, n. 1-2, p. 15-23, 2000.

GONCALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; MORAES, B.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G.; PINTO, M. V. M.; MATTA, S. L. P. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383-390, 2013.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; KAWASHIRO, K.; SAKANAKA, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 860-870, 2006.

KNABL, J. S.; BAUER, W.; ANDEL, H.; SCHWENDENWEIN, I.; DADO, P. F.; MITTLBOCK, M.; ROMER, W.; CHOI, M. S. S.; HORVAT, R.; MEISSEL, G.; FREY, M. M. Progression of burn wound depth by systemical application of a vasoconstrictor: an experimental study with a new rabbit model. **Burns**, v. 25, n. 8, p. 715-721, 1999.

KO, W. J.; NA, Y. C.; SUH, B. S.; KIM, H. A.; HEO, W. H.; CHOI, G. H.; LEE, S. U. The effects of topical agent (kelo-cote or contractubex) massage on the thickness of post-burn scar tissue formed in rats. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 6, p. 697-704, 2013.

LABUS, W.; KAWECKI, M.; NOWAK, M. The role of tissue engineering in the treatment of burn wounds. **Pol Przegl Chir**, v. 84, n. 3, p. 167-71, 2012.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELORICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003.

RENNO, A. C. M.; IWAMA, A. M.; SHIMA, P.; FERNANDES, K. R.; CARVALHO, J. G.; OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D. A. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of

second-degree skin burns in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, n. 5, p. 237-242, 2011.

NUNEZ, S. C.; FRANÇA, C. M.; SILVA, D. F. T.; NOGUEIRA, G. E. C.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633-641, 2013.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int J Biomater**, v. 23: 2253-2266, 2011.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2010.

SOTO-PANTOJA, D. R.; SHIH, H. B.; MAXHIMER, J. B.; COOK, K. L.; GHOSH, A.; ISENBERG, J. S.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin-1 and CD47 signaling regulate healing of thermal injury in mice. **Matrix Biology**, v. 37, p. 25-34, 2014.

SUN, G.; ZHANG, X.; SHEN, YU-I.; SEBASTIAN, R.; DICKISSON, L. E.; TALBOT, K. F.; REINBLAT, M.; STEENBERGEN, C.; HARMON, J. W.; GERECHT, S. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 20976-20981, 2011.

TIM, C. R.; PINTO, K. N. Z.; ROSSI, B. R. O.; FERNANDES, K.; MATSUMOTO, M. A.; PARIZOTTO, N. A.; RENNO, A. C. M. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Laser Medicine Science**, 2013.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4162-4168, 2011.

PESSOLATO, A. G. T.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A. F.; CARVALHO, A. F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

6. Estudo II

EFEITOS COMPARATIVOS DE DUAS DOSES DIFERENTES DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS.

Patricia Brassolatti¹, Paulo Sérgio Bossini¹, Maria Carolina Derêncio Oliveira², Hueliton Wilian Kido³, Carla Roberta Tim³, Luciana Almeida-Lopes⁴, Lucimar Retto da Silva de Avó⁵, Fernando M. Araújo-Moreira⁶, Nivaldo Antonio Parizotto¹.

¹Departamento de Fisioterapia, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

²Departamento de Fisioterapia, Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

³Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brasil

⁴DMC Importação e Exportação de Equipamentos-Ltda, São Carlos, SP, Brazil.

⁵Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

⁶Departamento de Física, Pós-Graduação do Programa de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

6.1 Resumo

Queimaduras são lesões teciduais que ocorrem por contato direto ou indireto a agentes químicos, físicos ou biológicos. Diante dos tratamentos existentes, a terapia laser de baixa intensidade (LLLT) vem se destacando, por ser um tratamento não invasivo, de baixo custo e possuir mecanismos capazes de induzir a proliferação celular. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da LLLT (660 nm), com duas fluências distintas, (12.5J e 25J) em queimaduras terceiro grau em ratos. Trinta ratos (Wistar) foram utilizados, e foram divididos em três grupos. A indução da queimadura nos animais foi realizada através de um ferro de solda aquecido a 150°C, pressionada no dorso por 10 segundos. LLLT foi iniciada imediatamente após a indução da queimadura, e nos dias 2, 4, 6 e 8 após o estabelecimento da lesão. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A análise histológica revelou diminuição do infiltrado inflamatório nos animais do grupo laser tratado com 25J/cm², e infiltrado inflamatório intenso nos grupos controle e tratado com 12.5J/cm². A imunexpressão da COX-2 foi mais intensa nos grupos controle e laser tratado com 12.5J/cm² quando comparado ao grupo laser tratado com 25J/cm². Já a imunexpressão do VEGF foi mais expressiva no grupo laser tratado com 25J/cm² do que nos outros dois grupos avaliados. Diante disso, nossos resultados sugerem que a utilização de 25J/cm² e 5J de energia total, foi mais eficaz em estimular os processos celulares necessários para que ocorra o reparo tecidual em queimaduras de terceiro grau em ratos, por reduzir a fase inflamatória e estimular a angiogênese, restabelecendo a microcirculação local, que é indispensável para a migração celular.

Palavras-chave: Queimaduras, processo de cicatrização, LLLT

6.2 INTRODUÇÃO

Queimaduras são causadas por contato direto ou indireto com agentes químicos, físicos ou biológicos (PESSOLATO et al., 2011; De MORAES et al., 2013) e, estão associadas a destruição tecidual, infecção, dor e até mesmo morte (EZZATI et al., 2009; RENNÓ et al., 2011). O número de casos é estimado em torno de 1 milhão ao ano somente nos Estados Unidos (USA), e por isso são associadas a consideráveis problemas socioeconômicos devido aos altos custos de tratamento (RENNÓ et al., 2011; FIÓRIO et al., 2014).

A classificação da lesão está relacionada à sua profundidade e extensão, e são divididas em lesões de primeiro, segundo e terceiro grau (SOUZA et al., 2014). Embora sejam menos comuns, as lesões de terceiro grau são consideradas como as mais graves por envolverem a destruição total da epiderme e da derme, e por provocar elevado estresse fisiológico no organismo (VASHEGHANI et al., 2008; FIÓRIO et al., 2014).

O processo de cicatrização é complexo e segue uma série de estágios interdependentes e simultâneos, denominados de coagulação, inflamação, proliferação e remodelamento (VASHEGHANI et al., 2008; RENNÓ et al., 2011; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014). Dentre as abordagens de tratamento apresentadas nos últimos anos, tais como, enxertos (SHEVCHENKO; JAMES; JAMES, 2010), curativos biológicos (SASKA et al., 2011) e curativos a base de colágeno (BRAZIULIS et al., 2012), destaca-se atualmente a terapia laser de baixa intensidade (LLLT) (EZZATI et al., 2009; RENNÓ et al., 2011; FIÓRIO et al., 2014).

A ação do laser é baseada na absorção da luz laser por fotorreceptores específicos do tecido, dos quais o mais conhecido é o citocromo c oxidase. Após a absorção da luz, importantes mudanças no metabolismo celular são observadas. Primeiramente, podemos descrever o aumento da produção de ATP celular advindo do estímulo à cadeia transportadora de elétrons localizada no interior da mitocôndria, seguido de aumento na síntese de DNA e RNA, que atua

diretamente na regulação do ciclo celular favorecendo a síntese proteica, a proliferação celular (KARU, 2010; RENNÓ et al., 2011; AVCI et al., 2013; NOVAES et al., 2014), o processo de angiogênese (BOSSINI et al., 2009; COLOMBO et al., 2013) e a ação dos miofibroblastos (MEDRADO et al., 2003; DANTAS et al., 2011). Dentre os efeitos terapêuticos obtidos, podemos destacar a redução do edema, redução da inflamação tecidual e estímulo à síntese de colágeno (EZZATI et al., 2009; KARU, 2010; RENNÓ et al., 2011; AVCI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

Para se obter os efeitos mencionados, os parâmetros empregados na aplicação da LLLT devem seguir um ajuste compatível com a patologia e a profundidade do tecido a ser tratado (AVCI et al., 2013), porém encontramos discrepância nos valores apresentados na literatura, principalmente nos protocolos aplicados em queimaduras (EZZATI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014; NOVAES et al., 2014).

Fiório et al. (2014) avaliaram os efeitos da LLLT (660 nm) em duas fluências diferentes, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $4\text{J}/\text{cm}^2$, em queimaduras de terceiro grau em ratos. Os autores observaram que ambas fluências estimularam a síntese de fibras de colágeno, e que a fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$ mostrou-se ainda eficaz em acelerar a fase inflamatória. Núñez et al. (2013) utilizaram, $1\text{J}/\text{cm}^2$ e $4\text{J}/\text{cm}^2$, para o mesmo modelo experimental, e observaram que a maior fluência aplicada em uma única dose pode estimular o influxo de neutrófilos, porém os grupos ao décimo dia ainda apresentavam úlceras teciduais. Meirelles et al. (2008), avaliou os efeitos da LLLT em queimaduras de terceiro grau em ratos diabéticos, em dois comprimentos de ondas diferentes (660 nm e 780 nm) com fluência de $20\text{J}/\text{cm}^2$, e observou resultados positivos com diminuição da inflamação, estímulo à formação de tecido de granulação e deposição de fibras de colágeno. Estes resultados também foram observados por Rennó et al. (2009), que utilizaram a mesma fluência em queimaduras de segundo grau em ratos.

Portanto, nota-se que a LLLT vem surgindo como alternativa promissora no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau. Um ponto importante a ser ressaltado na utilização da LLLT é que se trata de um recurso não invasivo e também apresenta custos relativamente baixos. Contudo, existem divergências em relação aos melhores parâmetros da LLLT para acelerar o reparo tecidual, principalmente em relação à escolha da fluência e energia total a ser utilizada no tratamento. Antes da utilização dessa nova terapia como modalidade terapêutica, há necessidade de investigar os efeitos dose-resposta desse tratamento em estudos *in vivo* e dos parâmetros mais adequados para tratamento, com intuito de determinar a sua eficácia e segurança. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo analisar os efeitos da LLLT (660 nm), em duas diferentes fluências, em queimaduras de terceiro grau em ratos.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com o Manual de Cuidados e Uso de Animais em Laboratório e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, parecer n°022/2013.

6.2.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados 30 ratos machos *Wistar* (12 semanas de idade, ± 280 g), mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada (19-23 °C), ciclo de claro-escuro (12-12 horas) e livre acesso a comida e a água. Os animais foram então distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, com 10 animais cada, sendo: grupo controle (GC): submetidos a queimadura, sem receber nenhum tipo de tratamento; grupo *laser* 12,5J/cm² (GL12,5): submetidos à queimadura e tratados com LLLT, 12,5 J/cm² e 0,5J de energia por ponto,

totalizando 2,5 J; grupo *laser* 25 J/cm² (GL25): submetidos à queimadura e tratados com LLLT 25 J/cm² e 1J de energia por ponto, totalizando 5J.

6.2.2 Procedimento da Queimadura

A queimadura foi induzida na região dorsal dos animais que estavam previamente anestesiados (Ketamina (95 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) e tricotomizados. A queimadura foi realizada com uma placa de alumínio de 1 cm² acoplada a um ferro de solda (KIMURA et al., 2006; BUSUIOC et al., 2013; KO et al., 2013) com temperatura de 150 °C, controlada com auxílio de um termostato e pressionada na pele do animal por 10 segundos (CAMPELO et al., 2011; KO et al., 2013). A lesão foi analisada previamente em estudo piloto por um patologista experiente, e então classificada como terceiro grau por apresentar necrose na epiderme, derme e seus anexos, com presença de bolhas intra e subepidérmica. Imediatamente após a lesão, os animais receberam 6,2 mg/Kg⁻¹ de dipirona sódica e, em seguida, o tratamento proposto para cada grupo.

6.2.3 Terapia *laser* de Baixa Intensidade

O equipamento laser AsGaInP utilizado foi (Therapy XT, DMC São Carlos/SP, Brasil), 660 nm, 0,04 cm de diâmetro do feixe, nas fluências de 12,5 J/cm² (50 mW) e 25 J/cm² (100 mW), com tempo de irradiação de 10 segundos por ponto e energia por ponto de 0,5 J e 1 J, respectivamente. A irradiação *laser* foi iniciada imediatamente após a indução da queimadura, e nos dias 2, 4, 6 e 8 após o estabelecimento da lesão. O método de aplicação utilizado foi o pontual em contato, em cinco pontos distintos de aplicação, quatro deles localizados na borda da lesão e um ponto localizado em sua região central. No décimo dia após a indução da lesão,

os ratos foram sacrificados com uma injeção intra-peritoneal de anestésico geral e as amostras foram coletadas para realização das análises.

6.2.4 Análise Histopatológica

A área total da queimadura foi coletada, fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany), emblocadas em parafina e cortadas em secções transversais com espessura padronizada de 5 μ m. Foram realizados três cortes semi-seriados de cada amostra que, posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck). A avaliação histológica foi realizada por patologista experiente, em estudo duplo cego, através de análise em um microscópio de luz (Zeiss Axioshop, Carl Zeiss, Rio de Janeiro, Brasil), com objetiva de 40x. Foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de fibrose, ulcerações e infiltrado inflamatório.

6.2.5 Morfometria de Vasos Sanguíneos

Para a análise quantitativa de vasos sanguíneos, foram capturados três campos distintos da região da derme de cada amostra, denominados C1 e C2 os campos correspondentes às bordas esquerda e direita da lesão respectivamente, e C3 correspondente a região central. Para isso foi utilizado um microscópio de luz (leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany), com objetiva de 40x, com auxílio de um programa de imagens Motican 5.0, e a partir disto, os vasos presentes em cada campo foram contados. Posteriormente, uma média foi estabelecida para cada animal, e este resultado foi utilizado para a determinação da média do número de vasos de cada grupo experimental. A média final do número de vasos foi considerada por análise

estatística (BOSSINI et al., 2009; NÚÑEZ et al., 2013). Toda a análise foi realizada em estudo cego por patologista experiente.

6.2.6 Birrefringência

Secções histológicas coradas pelo método de picrossírius-red foram analisadas em um microscópio de luz polarizada, para avaliar a deposição de fibras de colágeno presentes na região da derme. Este método permite uma avaliação qualitativa e quantitativa do estágio de organização da matriz tecidual baseado nas propriedades de birrefringência das fibras de colágeno (DANTAS et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

Para a análise quantitativa foi utilizado o software Image J (version 1.36), que possibilita quantificar o brilho de birrefringência, calculando a intensidade de “pixels” através da coloração do picrossírius-red sob a luz polarizada. A intensidade de “pixel” é proporcionalmente relacionada à organização das fibras de colágeno. As fibras de colágeno mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se em tons de laranja ou vermelho, nas fibras onde o colágeno tem propriedades mais anisotrópicas (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; BOSSINI et al., 2012). Para isso, três campos consecutivos localizados na região central de cada amostra, foram fotografados com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada em um aumento de 200x (COLOMBO et al., 2013). Os valores correspondentes de cada campo foram mensurados, resultando na quantidade de fibras de colágeno birrefringentes presentes na camada da derme de cada animal (BOSSINI et al., 2012).

6.2.7 Análise Imunohistoquímica

Cortes histológicos dos espécimes (4 µm de espessura) foram coletados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material biológico estudado, e depois mantido em estufa por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foi realizada a desparafinização e hidratação das secções histológicas. Os cortes foram posteriormente demarcados com caneta hidrofóbica e lavados em solução tampão com Tween duas vezes por três minutos. Posteriormente, os cortes foram deixado por 10 minutos em solução de bloqueio da peroxidase endógena, lavado em solução tampão por duas vezes, seguido de 20 min em solução de bloqueio da reação do peróxido de hidrogênio. As amostras foram, então, incubadas com anticorpo policlonal primário anti-COX-2 (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:200 ou anticorpo policlonal primário anti-VEGF (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:400, deixados por 2 horas, seguidos de dois banhos de solução tampão por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vetor Laboratórios) em concentração de 1:200 em PBS por 30 minutos. Após este processo as amostras foram lavadas em PBS por duas vezes antes da aplicação do complexo avidina biotina conjugada com peroxidase (Vetor Laboratórios) por 30 minutos. A visualização dos complexos ligados foi realizada com aplicação de 0,05% de solução de 3'3 diaminobenzidine e o contraste foi dado pela hematoxilina de Harris (Vetor Laboratórios) (RENNÓ et al., 2011).

A imunoexpressão da COX-2 e do VEGF foi avaliada de forma qualitativa indicando a presença de imunomarcacão, e também de forma semi-quantitativa através da captura de três campos consecutivos, utilizando para isto um microscópio de luz (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). De acordo com estudos anteriores, foi utilizada para a análise semi-quantitativa uma escala por score de 1-4 (1=ausente; 2=leve, 3=moderado e 4=intenso) (PINTO et al., 2013). Toda a análise foi realizada por patologista experiente em estudo cego.

6.2.8 Análise Estatística

Para comparação dos valores apresentados entre os grupos, foi utilizado o teste de variância (ANOVA) one-way, complementada posteriormente com teste de Tukey. O programa utilizado na análise foi o Statistica versão 7.0 (Sistema de Software-Soft Inc.), e os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Análise Histopatológica

A análise histopatológica revelou diferenças no estágio de cicatrização apresentado por cada grupo estudado, ou seja, os grupos apresentaram características diferentes de fase do processo de cicatrização. Nos grupos (GC e GL12,5) foi encontrado infiltrado inflamatório e fibrose tecidual mais intensos quando comparados ao GL25 que apresentou o infiltrado inflamatório e a fibrose tecidual de forma leve. Além disso, o GL12,5 revelou presença de ulcerações teciduais que não foram observadas nos outros dois grupos (GC e GL25), o que sugere um significativo atraso na evolução do processo de cicatrização apresentado por este grupo. O GC apresentou características evidentes de fase ainda inicial, caracterizada pela inflamação, quando comparado ao GL25, mas revelou maior avanço do que o GL12,5 em relação à epitelização. O GL25 promoveu rápida evolução do processo de cicatrização, evidenciada pela proliferação celular. Entretanto, os outros dois grupos (GC e GL12,5) apresentaram características de fase inflamatória (Figura 12).

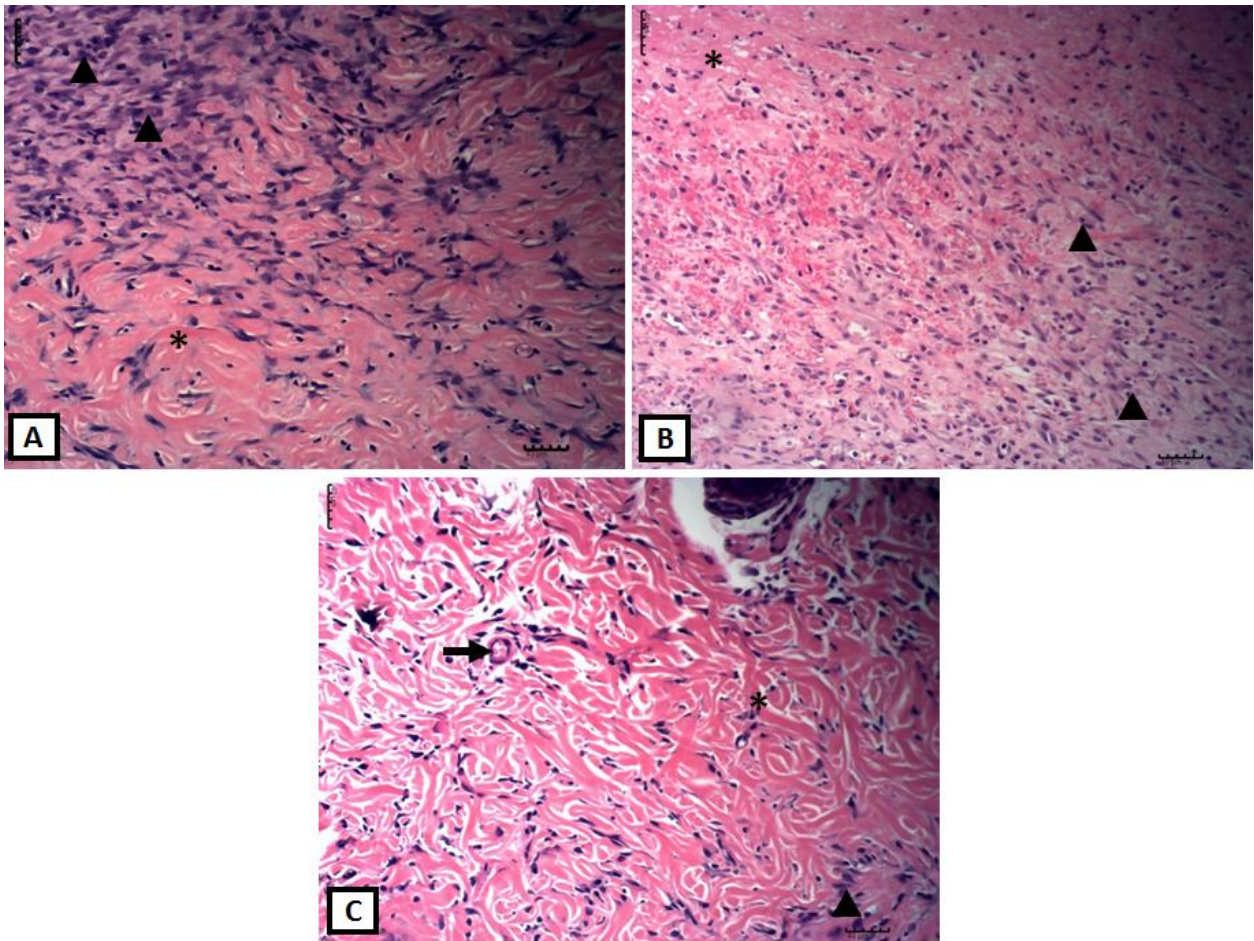


Figura 12.- Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. (*) fibrose, (▲) infiltrado inflamatório, (seta preta) vaso sanguíneo. A - grupo controle representando a pele somente com a queimadura (GC), B – grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm² (GL12,5), C – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm² (GL25). (Coloração: HE, Barra = 40µm).

6.3.2 Morfometria de Vasos Sanguíneos

A contagem dos vasos foi realizada predominantemente na camada da derme reticular. Foi possível observar que o GL25 apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos quando

comparado ao GL12,5 e ao GC. Na comparação do GC com o GL 12,5 não foi observada diferença estatisticamente significativa (Figura 13), considerando $p < 0,05$.

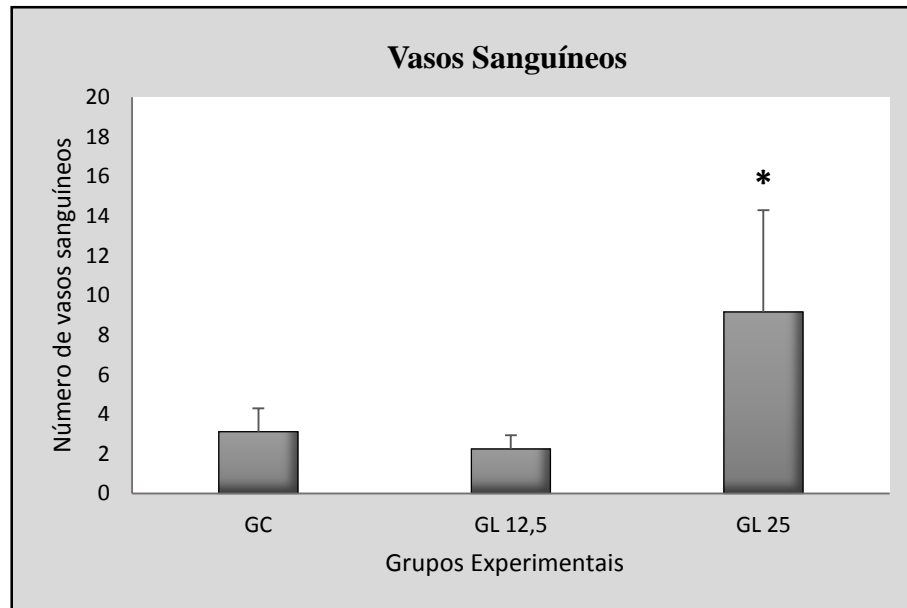


Figura 13. - Número de vasos sanguíneos. (GC) - grupo controle; (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (GL25) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC e GL12,5.

6.3.3. Birrefringência

Na análise da porcentagem de fibras de colágeno representada na figura 14, encontramos diferenças significativas entre GL12,5 e os grupos GC e GL25. O GL12,5 apresentou menor porcentagem de fibras de colágeno em relação aos grupos GC e GL25. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando comparamos somente os grupos GC e GL25.

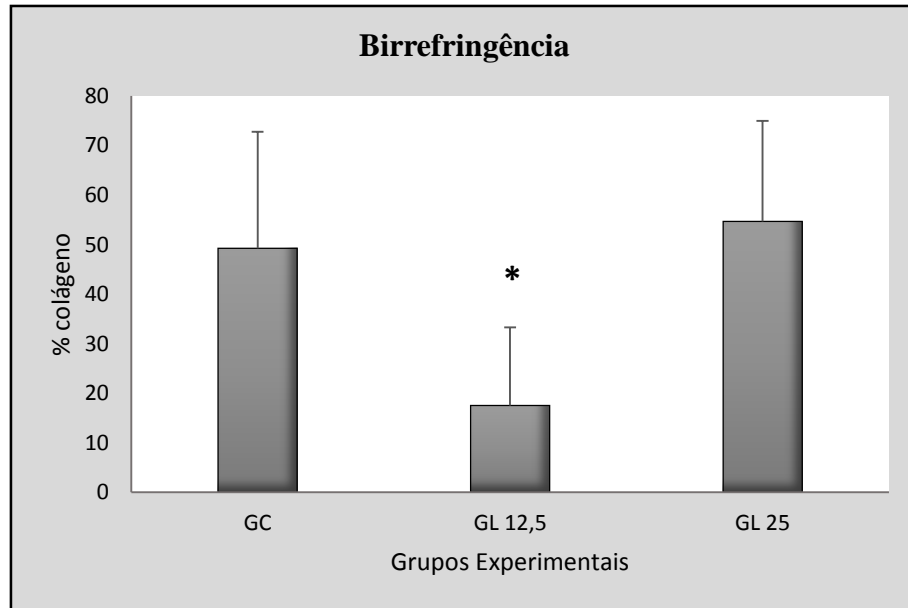


Figura 14. – Porcentagem de fibras de colágeno. (GC) - grupo controle; (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm²; (GL25) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC e GL25.

6.3.4. Análise Imunohistoquímica

A expressão da COX-2 foi observada no citoplasma das células inflamatórias. O GL25 apresentou leve imunomarcção da COX-2 quando comparada a intensa imunomarcção encontrada nos grupos GC e GL12,5. Na comparação dos grupos GC e GL 12,5 não foram encontradas diferenças significativas (Figura 15).

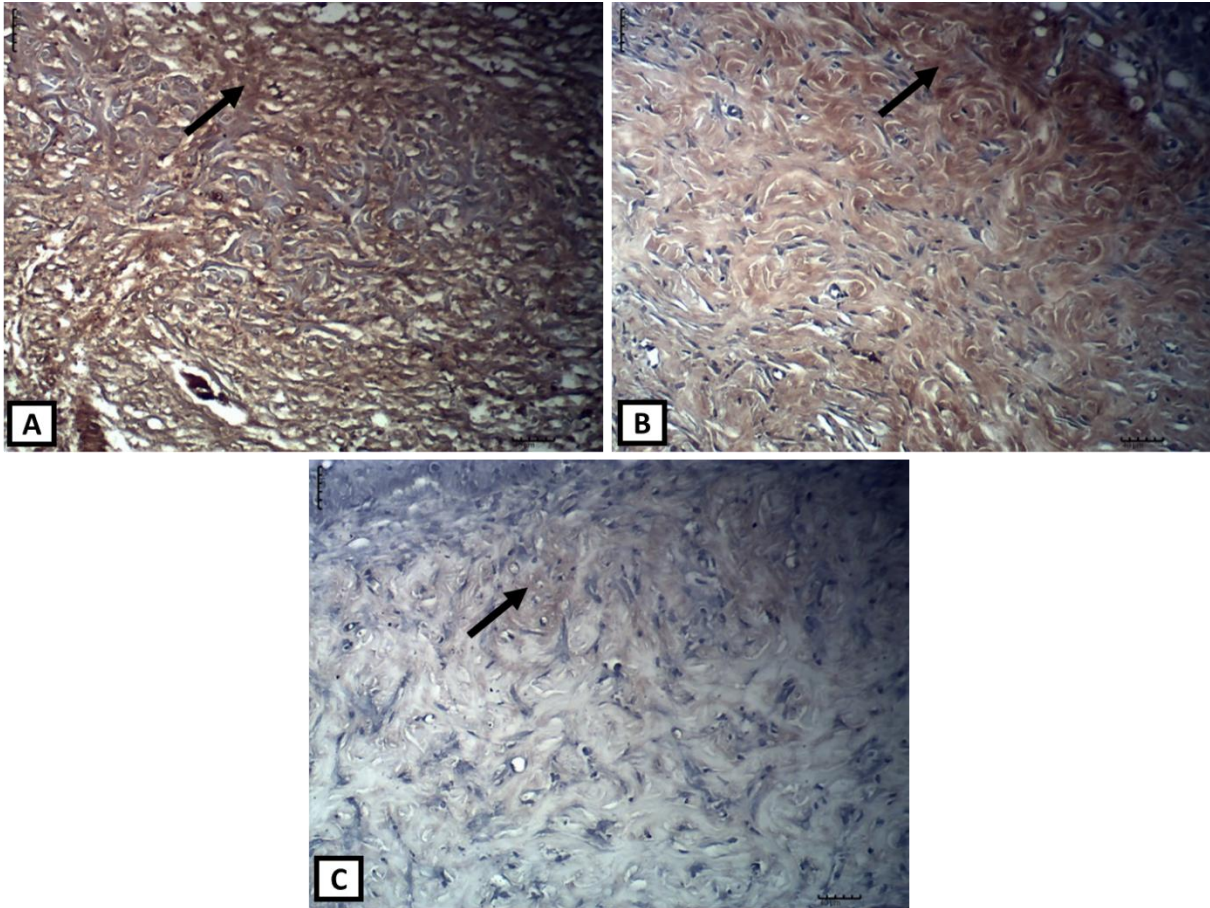


Figura 15. - Imunohistoquímica da COX-2: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com LLLT na fluência de $12,5 \text{ J/cm}^2$; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm^2 . As setas indicam a imunomarcção da COX-2 nos tecidos. (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = $40\mu\text{m}$).

A figura 16. ilustra a análise semi-quantitativa da COX-2 realizada através de escore. Os resultados desta análise confirmam os achados na análise qualitativa, onde o GL25 apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos GC e GL12,5 por apresentar a menor quantidade de COX-2. Na comparação dos grupos (GC e GL12,5) nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

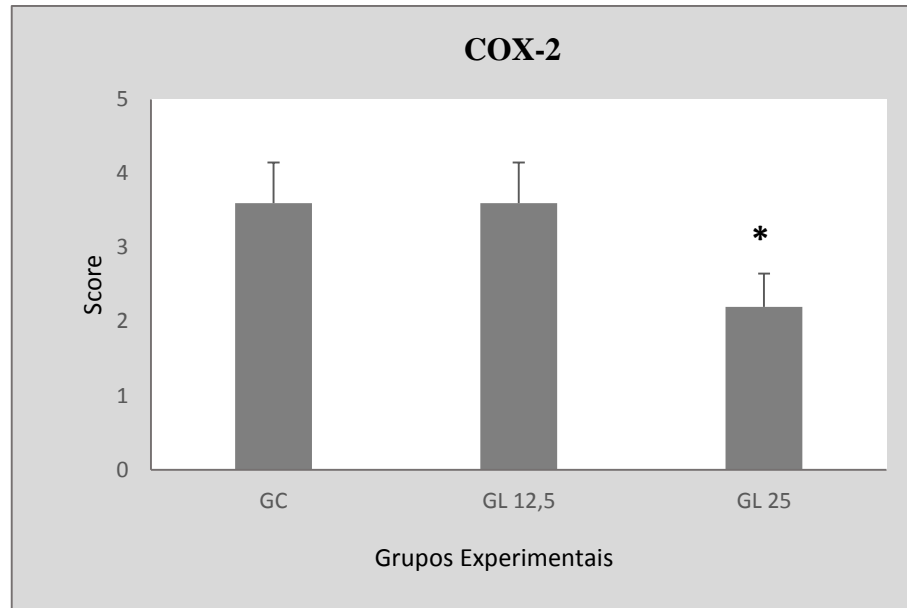


Figure 16. – Análise semi-quantitativa da COX-2 determinada através de escore. (CG) grupo controle, (GL12,5) – grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5 J/cm², (GL25) – grupo tratado com LLLL na fluência de 25 J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC e GL12,5.

A imunoposição do VEGF foi detectada tanto nas células do interstício quanto nas células presentes nas paredes dos capilares. Interessantemente, os grupos apresentaram a imunomarcção de maneira diferenciada. O GL25 foi o que apresentou a maior imunomarcção, demonstrando assim expressivo recrutamento celular com formação de vasos sanguíneos no local. O GC revelou a imunomarcção de maneira moderada com a presença de poucos vasos sanguíneos. O GL12,5 foi o grupo que apresentou o menor recrutamento celular necessário para a formação de novos vasos e devido a isso, sua imunomarcção apresentou-se de forma leve (Figura 17).



Figura 17. - Imunohistoquímica do VEGF: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com LLLT na fluência de $12,5 \text{ J/cm}^2$; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm^2 . Setas mostram a imunomarcagem dos vasos no tecido. (Coloração: Imunohistoquímica, Barra = $40\mu\text{m}$).

Os resultados semi-quantitativos da análise do VEGF, confirmam os resultados obtidos na análise descritiva. Foi identificada diferença estatisticamente significativa na imunopressão apresentada pelo grupo GL 25, quando comparado aos grupos GC e GL12,5. O GL25 apresentou a imunopressão de forma intensa quando comparada ao grupo controle que demonstrou a imunopressão de forma moderada com presença de poucos vasos

sanguíneos, e ao GL12,5 que apesar de demonstrar uma imunopressão com características moderadas apresentou ainda, menor número de vasos que o GC. (Figura 18).

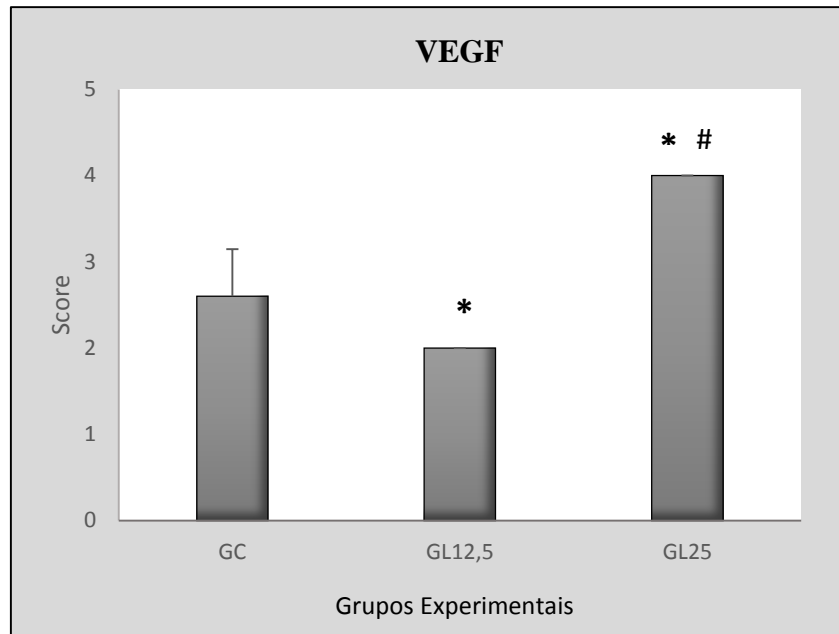


Figura 18. – Análise semi-quantitativa do VEGF, determinada através de score. (GC) - grupo controle, (GL12,5) - grupo tratado com LLLT na fluência de 12,5J/cm², (GL25) – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC; # p ≤ 0,05 versus GC e GL12,5.

6.4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a utilização de diferentes fluências, em um mesmo comprimento de onda, proporcionam ao processo de cicatrização estímulos e respostas teciduais diferentes. Ainda, há na literatura, divergências em relação aos valores de fluências utilizados nos tratamentos de feridas, pois valores entre 2-4J/cm² antes considerados ideais (MEDRADO et al., 2003; MESTER, 2013; NOVAES et al., 2014), são atualmente contraditórios, já que trabalhos atuais mostram que valores próximos a 20 J/cm² são capazes de induzir melhores efeitos nas fases de inflamação e proliferação, além de estimular o processo

de angiogênese (CORAZZA et al., 2007; MEIRELES et al., 2008; BOSSINI et al., 2009; RENNÓ et al., 2011).

Foi possível avaliar este fato em nosso trabalho. No período experimental avaliado, evidenciamos importantes diferenças teciduais que caracterizaram fases distintas do processo de cicatrização em cada grupo experimental submetido ao tratamento com LLLT. Os resultados encontrados no GL12,5, como intenso infiltrado inflamatório, presença de fibrose e ulcerações teciduais, estão de acordo com os achados de Núñez et al. (2013), porém contradizem os estudos que relatam encontrar resultados positivos na diminuição da fase inflamatória e estímulo a fase proliferativa quando submetidos a LLLT com valores de fluências menores (MEDRADO et al., 2003; FIÓRIO et al., 2014).

Por outro lado, os resultados encontrados no GL25 como melhor organização tecidual e restabelecimento da epiderme e derme, caracterizado pela fase proliferativa, estão de acordo com os achados de Meirelles et al. (2008), que também investigaram a ação da LLLT, 660nm, 20 J/cm² em queimaduras de terceiro grau em ratos, e observaram que os grupos tratados apresentaram maior formação de tecido de granulação e, conseqüentemente, maior estímulo ao processo de angiogênese. Podemos evidenciar ainda, que estes achados estão de acordo com os estudos que investigam a utilização de fluências próximas a 20J/cm² para evolução do processo de cicatrização em pele (CORAZZA et al., 2007; BOSSINI et al., 2009). Isto sugere que maiores quantidades de energia depositadas no tecido foram mais eficazes em otimizar a fase inflamatória, estimulando a produção do tecido de granulação com formação e restabelecimento da nova rede vascular.

Estudos que investigam a ação da LLLT em queimaduras de terceiro grau, enfatizam que a ação da luz laser é capaz de acelerar o processo de reparo tecidual por alterar o ambiente celular e melhorar a formação vascular, bem como estimular a produção de fibrina, síntese de colágeno e a conversão de fibroblastos em miofibroblatos responsáveis em induzir a retração

das bordas da ferida (MEIRELES et al., 2008; RENNO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013).

Neste estudo, foi possível destacar três características primordiais de avaliação e correlação que podem explicar os resultados encontrados. Em primeiro lugar a avaliação da COX-2, uma enzima produzida através de estímulos pró-inflamatórios e pertencente a cascata de conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que atua quando há dano tecidual. Além de participar da fase inflamatória, sua presença nos estágios mais tardios do processo de reparo, pode estar relacionada à formação de fibrose tecidual, com possíveis falhas na resolução do processo como um todo (FUTAGAMI et al., 2002; LEE et al., 2003). A intensa imunomarcagem observada nos grupos GL12,5 e GC sugerem o atraso encontrado na evolução do processo de cicatrização destes grupos, revelando intensa fibrose tecidual diferentemente do encontrado no GL25, que respondeu positivamente ao tratamento otimizando a fase inflamatória promovendo uma rápida evolução para a fase proliferativa.

A segunda característica avaliada foi a relação entre a imunoexpressão do VEGF e a quantidade de número de vasos sanguíneos, que são fatores intimamente interligados. Rennó et al. (2009) descreve que a utilização da LLLT 660, 100 mW, 0,5 J foi capaz de estimular precocemente o VEGF em queimaduras de segundo grau em ratos, e conseqüentemente o processo de angiogênese apresentou-se aumentado, igualmente aos resultados obtidos em nosso estudo em relação ao GL25. Em contrapartida, os resultados apresentados pelo GL12,5 em relação a estes parâmetros contradizem os achados por Núñez et al. (2013) e Fiório et al. (2014), sugerindo que a energia total aplicada neste grupo poderia ter sido insuficiente para atingir determinados estímulos, como adequada perfusão sanguínea e migração celular local.

A terceira e última característica a ser ressaltada é relacionada à síntese e organização das fibras de colágeno, que também apresentaram diferenças tanto a quantidade, quanto a organização entre os grupos estudados. Gonçalves et al. (2013) relataram que a maturação do

colágeno e seu rearranjo são etapas cruciais que atingem diretamente a resistência mecânica do novo tecido. Esta maturação ocorre com o remodelamento e substituição gradual do colágeno pré-formado tipo III para colágeno tipo I, gerando aumento nas interações moleculares entre as fibras neoformadas. Meirelles et al. (2008), relataram que esta maturação pode ser observada com 21 dias de tratamento quando a fluência utilizada foi de 20 J/cm². Em nosso estudo esta diferença na síntese e organização das fibras foi precocemente observada no décimo dia do período experimental, onde o GL25 apresentou além de organização estrutural das fibras, que estavam acomodadas paralelamente no tecido, uma maior quantidade de fibras. Isso revela uma interligação de todos os resultados apresentados por esse grupo experimental, onde conseguimos perceber que a quantidade de energia total de 5 J depositada no tecido foi capaz de acelerar a fase inflamatória e promover a proliferação de fibroblastos e tecido de granulação necessários para a melhor síntese de colágeno, resultando no reparo cutâneo.

Neste sentido, os resultados encontrados sugerem que a utilização da LLLT (660 nm), com maior fluência e, conseqüentemente, maior energia total, demonstrou ser mais eficaz em estimular as fases do processo de cicatrização, otimizando o tempo gasto para a resolução do restabelecimento tecidual na área da lesão de queimaduras de terceiro grau em ratos. Porém, diante da diversidade de protocolos existentes na literatura aplicados para a mesma finalidade, estudos futuros devem ser realizados, na intenção de entender melhor os mecanismos da ação da LLLT sobre o processo de cicatrização de queimaduras e assim, determinar o melhor protocolo de tratamento a ser utilizado neste tipo de lesão.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52, 2013.
- BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R. M.; RENNÓ, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 209-213, 2009.
- BRAZIULIS, E.; DIEZI, M.; BIEDERMANN, T.; PONTIGGIA, L.; SCHMUCKI, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; LUGINBUHL, J.; SCHIESTL, C.; MEULI, M.; REICHMANN, E. Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes. **Tissue Engineering Part C-Methods**, v. 18, n. 6, p. 464-474, 2012.
- BUSUIOC, C. J.; MOGOSANU, G. D.; POPESCU, F. C.; LASCAR, I.; PARVANESCU, H.; MOGOANTA, L. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: histological and immunohistochemical study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 54, n. 1, p. 163-171, 2013.
- CAMPELO, A. P. B.; CAMPELO, M. W. S.; BRITTO, G. A. C.; AYALA, A. P.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cirúrgica brasileira*, v. 26, 2011.
- COLOMBO, F.; VALENÇA NETO, A. A. P.; SOUSA, A. P. C.; MARCHIONNI, A. M. T.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308-312, 2013-07, 2013.
- CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.
- DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAÚJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 1, p. 51-59, 2011.
- DE MORAES, J. M.; MENDONÇA, D. E. O.; MOURA, V. B. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; AFONSO, C. L.; VINAUD, M. C.; BACHION, M. M.; LINO JR., R. S. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1169-1176, 2013.
- EZZATI, A.; BAYAT, M.; KHOSHVAGHTI, A. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 46, n. 4, p. 543-554, 2009.
- FIORIO, F. B.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 313-319, 2014.

- FUTAGAMI, A.; ISHIZAKI, M.; FUKUDA, Y.; KAWANA, S.; YAMANAKA, N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 11, p. 1503-1513, 2002.
- GONCALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; MORAES, B.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G.; PINTO, M. V. M.; MATTA, S. L. P. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383-390, 2013.
- KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159-160, 2010.
- KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; KAWASHIRO, K.; SAKANAKA, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 860-870, 2006.
- KO, W. J.; NA, Y. C.; SUH, B. S.; KIM, H. A.; HEO, W. H.; CHOI, G. H.; LEE, S. U. The effects of topical agent (kelo-cote or contractubex) massage on the thickness of post-burn scar tissue formed in rats. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 6, p. 697-704, 2013.
- LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELORICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003
- MEDRADO, A.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239-244, 2003.
- MEIRELES, G. C. S.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 2008.
- MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, p. 237-239, 2013.
- PESSOLATO, A. G. T.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A. F.; CARVALHO, A. F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.
- RENNO, A. C. M.; IWAMA, A. M.; SHIMA, P.; FERNANDES, K. R.; CARVALHO, J. G.; OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D. A. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, n. 5, p. 237-242, 2011.
- NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C.; LEITE, J. P.; MATTA, S. L. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2, p. 138-146, 2014.
- NUNEZ, S. C.; FRANÇA, C. M.; SILVA, D. F. T.; NOGUEIRA, G. E. C.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633-641, 2013.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int J Biomater**, v. 23: 2253-2266, 2011.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2010.

SOUZA

TIM, C. R.; PINTO, K. N. Z.; ROSSI, B. R. O.; FERNANDES, K.; MATSUMOTO, M. A.; PARIZOTTO, N. A.; RENNO, A. C. M. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Laser Medicine Science**, 2013.

VASHEGHANI, M. M.; BAYAT, M.; REZAEI, F.; BAYAT, A.; KARIMIPOUR, M. Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2008.

7. ESTUDO III

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA E DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS

Patricia Brassolatti¹, Paulo Sérgio Bossini¹, Hueliton Wilian Kido², Luciana Almeida-Lopes³,
Lisinéia Maria Zanardi³, Marcos Aurélio Napolitano³, Lucimar Retto da Silva de Avó⁴,
Fernando M. Araújo-Moreira⁵, Nivaldo Antonio Parizotto¹.

¹Departamento de Fisioterapia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil.

²Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brazil.

³DMC Importação e Exportação de Equipamentos-Ltda, São Carlos, SP, Brazil.

⁴Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil.

⁵Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil.

7.1 RESUMO

Queimaduras são lesões ocasionadas principalmente por traumas térmicos. O processo de cicatrização é considerado complexo e pode evoluir para resultados estéticos e funcionais insatisfatórios. Diante disso, é extensa a busca por terapias capazes de otimizar o tempo de tratamento. Dentre essas, podemos destacar o uso dos biomateriais e da terapia laser de baixa intensidade (LLLT). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o biomaterial e a LLLT, de forma isolada e também associada, no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos. Quarenta ratos (Wistar) foram utilizados, divididos em grupo controle (GC), grupo membrana de celulose bacteriana pura (GM), grupo laser (660 nm, 25 J/cm²) (GL) e grupo membrana de celulose bacteriana pura e laser (660 nm, 25 J/cm²) (GM+L). A queimadura foi realizada através de uma placa de alumínio de 1cm² aquecida a 150°C, e pressionada no dorso do animal por 10 segundos. Os tratamentos foram realizados por dez dias e iniciaram-se logo após a indução da lesão em seus respectivos grupos. A aplicação da LLLT foi realizada imediatamente e nos dias 2, 4, 6 e 8 após a indução da lesão. A análise histológica revelou que houve diferença em relação à fase do processo de cicatrização de cada grupo experimental. O GM apresentou avanço no processo de cicatrização, evidenciando a fase proliferativa. O GL apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos e imunexpressão do VEGF, evidenciando os efeitos estimuladores da angiogênese fornecidos pela luz laser. Resultados similares aos do GL foram encontrados no GM+L. Assim, concluímos que embora a LLLT tenha apresentado os efeitos pró-inflamatórios esperados, que modulam a fase inflamatória e favorecem a regeneração tecidual, a ação isolada

da membrana de celulose bacteriana demonstrou vantagens de tratamento por proteger e favorecer a evolução do processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos.

Palavras-chave: Queimaduras, Celulose bacteriana, Biomaterial, LLLT.

7.2 INTRODUÇÃO

Queimaduras são definidas como lesões de pele ou outro órgão do corpo humano ocasionadas, principalmente, por traumas térmicos, como radiação, eletricidade e líquidos quentes (PECK, 2011; MORAES et al., 2013). Segundo a Associação Internacional de Queimaduras os registros de atendimento são de 486.000 por ano somente nos USA, sendo que destes, 3.400 evoluem a óbito (American Burn Association).

A gravidade da lesão está diretamente relacionada a sua profundidade e extensão (PESSOLATO et al., 2011; KNABL, et al., 1999), e são classificadas em lesões de primeiro, segundo e terceiro graus (SUN et al., 2011; SCWACHA et al., 2010).

O processo de cicatrização que tem início logo após o acometimento, é crucial para o restabelecimento do tecido lesado e compreende três fases distintas: inflamação, proliferação e remodelamento (VASHEGHANI et al., 2008; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

Atualmente, as estratégias de tratamentos direcionadas a auxiliar o processo de regeneração da pele, geralmente evoluem com resultados estéticos e funcionais insatisfatórios (TRAJANO et al., 2015; ZHANG et al., 2010). Devido a isso, observa-se um grande investimento nas áreas de medicina regenerativa e engenharia de tecidos, voltadas ao estudo e desenvolvimento de biomateriais capazes de auxiliar e favorecer o processo de reparo tecidual (CZAJA et al., 2007; CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009; BAXTER et al., 2013; ABEER; AMIN; MARTIN, 2014).

Neste contexto, os biopolímeros, como a celulose bacteriana, vêm se destacando por apresentarem características ideais como biocompatibilidade, pureza, cristalinidade,

hidrofilicidade (ALMEIDA et al., 2013; HU et al., 2014) e permeabilidade seletiva, o que promove uma efetiva barreira protetora contra riscos de contaminação advindos do meio externo (PORTAL; CLARK; LEVINSON, 2009; FU; ZHANG; YANG, 2013). Fu et al. (2012) em um estudo experimental de lesões profundas, observaram que os grupos que receberam tratamento com celulose bacteriana apresentaram significativa regeneração tecidual com formação de novos capilares na área da ferida quando comparados a tratamentos com gaze comercial e enxertos, e também ao grupo não tratado, sugerindo assim que este biomaterial é eficaz em auxiliar a cicatrização de feridas profundas.

Outro recurso frequentemente utilizado e destinado ao auxílio do processo de cicatrização de queimaduras é a Terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) (MEIRELES et al., 2008; EZZATI et al., 2009; RENNÓ et al., 2011; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

O mecanismo da LLLT é baseado na excitação dos cromóforos endógenos, que ocorre quando um determinado tecido biológico absorve a radiação da luz nos comprimentos de onda que compreendem o vermelho ou infravermelho próximo. As consequências desta absorção é a biomodulação das atividades biológicas celulares que culminam na ativação do metabolismo das proteínas, ácidos nucleicos e produção de ATP (adenosina trifosfato).

Diversos estudos relatam efeitos positivos da LLLT em queimaduras de terceiro grau; porém, ainda existe uma divergência significativa entre os parâmetros do laser utilizados para este tratamento (MEIRELES et al., 2008; VASHEGHANI et al., 2008; De MORAES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014). Meireles et al. (2008) relataram que a aplicação do laser (660 e 780 nm) em ratos diabéticos submetidos a queimadura de terceiro grau apresentam efeitos positivos, com aceleração do reparo tecidual. Nuñez et al. (2013) relatam que o laser 660 nm aplicado em duas diferentes fluências (1 e 4 J/cm²), foi capaz de promover um maior estímulo à formação de novos vasos sanguíneos, beneficiando a evolução do processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos.

Recentemente os tratamentos têm se direcionado a associação de terapias, como por exemplo, biomateriais e LLLT para o tratamento de feridas de pele (DANTAS et al., 2011; SOARES et al., 2008). No entanto, em queimaduras de terceiro grau ainda são escassas as informações sobre a contribuição benéfica que ambos tipos de terapias proporcionam, devido a diferenciação tanto na fabricação quanto nos componentes existentes nos biomateriais aplicados, bem como em relação aos parâmetros utilizados nos protocolos de aplicação da LLLT neste tipo de lesão.

Assim, o objetivo deste estudo, foi avaliar a ação das membranas de celulose bacteriana e da LLLT, de maneira isolada e também associada, no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com o manual de cuidados e uso de animais em laboratório e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, parecer n°022/2013. Um total de 40 ratos machos *Wistar* (12 semanas de idade, \pm 280 g) foram utilizados e, mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada (19-23 °C), ciclo de claro-escuro (12-12 horas) e livre acesso a comida e água. A queimadura foi induzida na região dorsal dos animais que estavam previamente anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) e tricotomizados. A queimadura foi realizada com uma placa de alumínio de 1 cm² acoplada a um ferro de solda (KIMURA et al., 2006; BUSUIOC et al., 2013; KO et al., 2013) com temperatura de 150°, que ficou pressionada no dorso do animal por 10 segundos (KO et al., 2013). Imediatamente após a lesão os animais receberam 6.2 mg/Kg⁻¹ de dipirona sódica e, em seguida, o tratamento proposto para cada grupo.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com 10 animais cada, grupo controle (GC): submetidos à queimadura, sem receber nenhum tipo de tratamento; grupo membrana de celulose bacteriana pura (GM): submetidos à queimadura e tratados com membrana de celulose bacteriana; grupo laser (GL): submetidos à queimadura e tratados com laser na fluência de 25 J/cm²; grupo membrana de celulose bacteriana pura e laser na fluência de 25 J/cm² (GM+L): submetidos à queimadura e tratados com membrana de celulose bacteriana pura e laser com fluência de 25 J/cm².

7.3.1 Membranas de Celulose Bacteriana

As membranas de celulose bacteriana foram cedidas pela empresa DMC Equipamentos – Ltda., São Carlos/SP, Brasil. Para sua obtenção, foram utilizadas cepas de bactéria do gênero *Acetobacter xilynum* em meios apropriados de cultura estático que favorecem a formação das nanofibras de celulose, formando como produto final uma membrana altamente hidratada. Após sua obtenção, as membranas foram submetidas ao procedimento de clareamento. Ao término do procedimento as membranas foram mantidas em estufa a 80° C para o processo de secagem e posteriormente encaminhadas para esterilização.

7.3.2 Terapia laser de Baixa Intensidade

Foi utilizado um laser diodo AsGaInP (Therapy XT, DMC Equipamentos-Ltda, São Carlos/SP, Brasil), 660 nm, 0,04 cm de diâmetro do feixe, fluência de 25 J/cm², potência de saída de 100 mW, com tempo de irradiação de 10 segundos e energia de 1J por ponto de aplicação. A irradiação laser foi iniciada imediatamente após o estabelecimento da lesão, totalizando cinco aplicações no período dez dias. O método de aplicação utilizado foi o pontual

em contato, com cinco pontos distintos de aplicação, sendo quatro deles localizados na borda da lesão e um ponto localizado em sua região central.

No décimo dia após a indução da lesão, os animais foram eutanasiados com uma injeção intra-peritoneal de anestésico geral e as amostras foram coletadas para realização das análises propostas.

7.3.3 Análise Histopatológica

Para a análise histopatológica, a extensão completa da área da lesão foi retirada e fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Germany). Em seguida foram emblocadas em parafina e cortadas em secções transversais com espessura padronizada de 5 μm . Para isso, três cortes semi-seriados de cada amostra foi realizado e, posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina (HE, Merck). A avaliação histológica foi realizada em um microscópio de luz (Zeiss Axioshop, Carl Zeiss, Rio de Janeiro, Brasil), com objetiva de 40x. Nesta análise, foram avaliados os seguintes parâmetros: presença de fibrose, espessura da epiderme, ulcerações e infiltrado inflamatório.

7.3.4 Morfometria de Vasos Sanguíneos

Para a análise quantitativa de vasos sanguíneos, foram capturados três campos distintos da região da derme de cada amostra, denominados C1 e C2 os campos correspondentes as bordas esquerda e direita da lesão respectivamente, e C3 correspondente a região central da lesão. Para isso foi utilizado um microscópio de luz (leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany), com objetiva de 40x, com auxílio de um programa de imagens Motican 5.0, e a partir disto, os vasos presentes em cada campo foram contados. Posteriormente, uma média foi

estabelecida para cada animal, e este resultado foi utilizado para a determinação da média do número de vasos de cada grupo experimental. A média final do número de vasos foi considerada por análise estatística (BOSSINI et al., 2009; NÚÑEZ et al., 2013). Toda a análise foi realizada em estudo cego por patologista experiente.

7.3.5 Birrefringência

As lâminas com secções histológicas coradas pelo método de picrossírius-red foram analisadas em um microscópio de luz polarizada. Este método permite uma avaliação qualitativa e quantitativa do estágio de organização da matriz tecidual baseado nas propriedades de birrefringência das fibras de colágeno (DANTAS et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013; FIÓRIO et al., 2014).

Para a análise quantitativa foi utilizado o software Image J (version 1.36), que possibilita quantificar o brilho de birrefringência, calculando a intensidade de “pixels” através da coloração do picrossírius-red sob a luz polarizada. A intensidade em “pixel” está proporcionalmente relacionada à organização das fibras de colágeno. As fibras de colágeno mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se em tons de laranja ou vermelho, que revela o colágeno com propriedades mais anisotrópicas (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; BOSSINI et al., 2012). Para isso, três campos consecutivos localizados na região central de cada amostra, foram fotografados com auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada em um aumento de 200x (COLOMBO et al., 2013). Os valores correspondentes de cada campo foram mensurados, resultando na quantidade de birrefringência das fibras de colágeno presentes na camada da derme de cada animal (BOSSINI et al., 2012). Todas as análises foram realizadas por um patologista experiente.

7.3.6 Análise Imunohistoquímica

Cortes histológicos dos espécimes (4 µm de espessura) foram coletados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material biológico estudado, e depois mantido em estufa por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foi realizada a desparafinização e hidratação das secções histológicas. Os cortes foram posteriormente demarcados com caneta hidrofóbica e lavados em solução tampão com Tween duas vezes por três minutos. Posteriormente, foi deixado por 10 minutos em solução de bloqueio da peroxidase endógena, lavado em solução tampão por duas vezes, seguido de 20 min em solução de bloqueio da reação do peróxido de hidrogênio. As amostras foram então incubadas com anticorpo policlonal primário anti-COX-2 (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:200 ou anticorpo policlonal primário anti-VEGF (Santa Cruz Biotecnologia) em uma concentração de 1:400, deixado por 2 horas, seguidos de dois banhos de solução tampão por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas ao anticorpo secundário anti-IgG (imunoglobulina G) de coelho (Vetor Laboratórios) em concentração de 1:200 em PBS por 30 minutos. Após este processo as amostras foram lavadas em PBS por duas vezes antes da aplicação do complexo avidina biotina conjugada com peroxidase (Vetor Laboratórios) por 30 minutos. A visualização dos complexos ligados, foi realizado com aplicação de 0,05% de solução de 3'3 diaminobenzidine e o contraste foi dado pela hematoxilina de Harris (Vetor Laboratórios).

A imunoexpressão da COX-2 e do VEGF foi avaliada de forma qualitativa indicando a presença de imunomarcacão e também de forma semi-quantitativa através da captura de três campos consecutivos da região da derme, utilizando para isto um microscópio de luz (leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). De acordo com estudos anteriores foi utilizado para a análise quantitativa uma escala por score de 1-4 (1=ausente; 2=leve, 3=moderado e 4=intenso) (PINTO et al., 2013). Toda a análise foi acompanhada por patologista experiente.

7.3.7 Análise Estatística

Para a análise estatística dois testes foram utilizados. O teste de variância (ANOVA) one-way, complementada posteriormente com teste de Tukey foram aplicados quando os valores foram determinados como paramétricos, e o teste de Kuskal-wallis foi aplicado para os valores determinados como não paramétricos. O programa utilizado na análise foi o Statistica versão 7.0 (Sistema de Software-Soft Inc.), onde os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Análise Histopatológica

A análise histológica revelou diferenças que caracterizam fases distintas do processo de cicatrização apresentadas entre os grupos experimentais analisados. O CG demonstrou características referentes a fase inicial do processo de cicatrização em relação aos demais grupos (GM, GL, GML), por apresentar intenso infiltrado inflamatório e intensa fibrose tecidual. O GM apresentou características de fase proliferativa, quando comparado aos demais grupos (GC, GL e GML), por apresentar melhor organização tecidual, leve infiltrado inflamatório e leve formação de fibrose, além de uma fina camada da epiderme e presença dos anexos da pele. As características dos grupos GL e GM+L evidenciam a transição entre a fase inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização, pois ambos os grupos apresentaram-se com moderado infiltrado inflamatório, moderada fibrose, organização tecidual e fina espessura

da camada da epiderme, porém diferem do encontrado no GC e GM. Todas as características, seguem representadas na Figura 19.

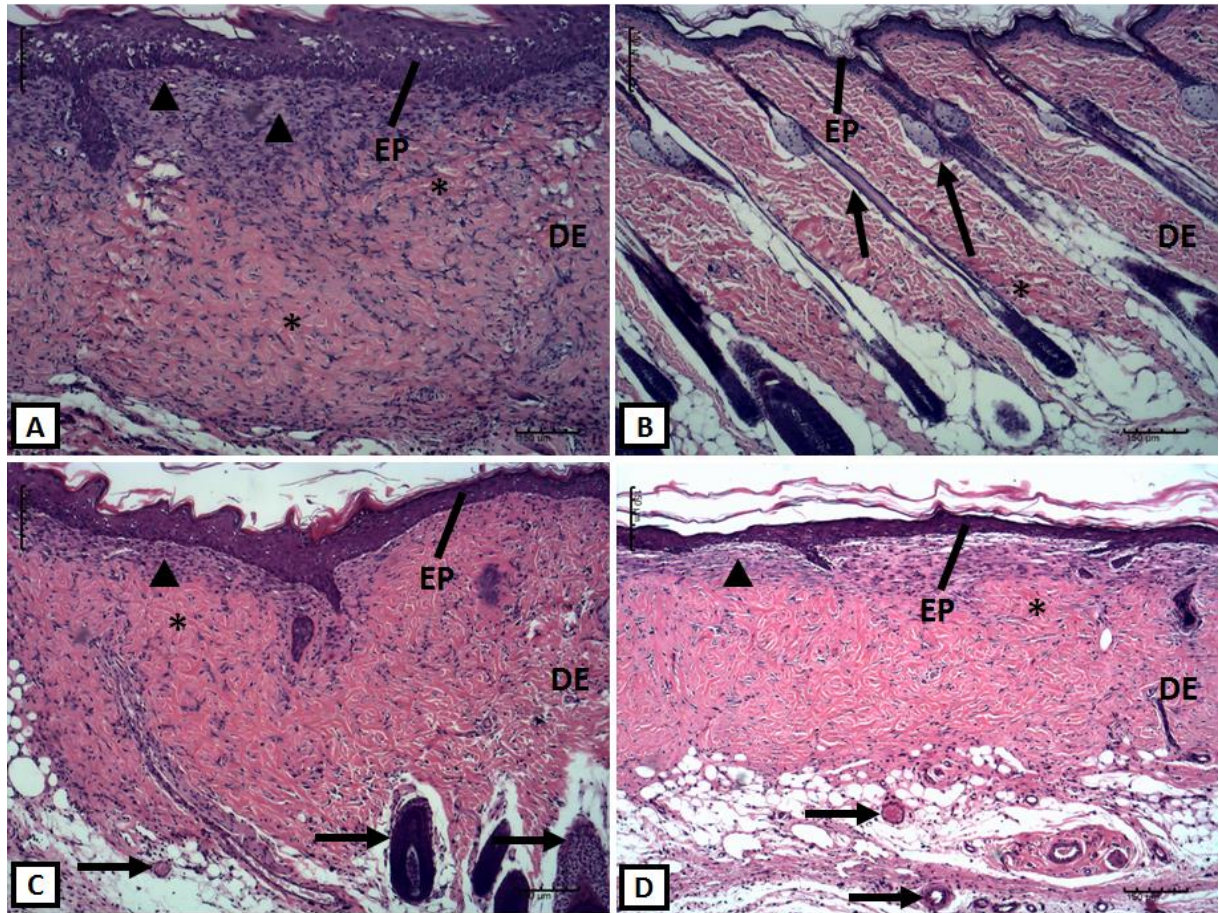


Figura 19.- Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. (DE) derme, (#) fibrose, (▲) infiltrado inflamatório, (seta preta) vaso sanguíneo. A - grupo controle representando a pele somente com a queimadura (GC), B – grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura (GM), C – grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm^2 (GL), D – grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm^2 (GM+L). (Coloração: HE, Barra = $40\mu\text{m}$).

7.4.2 Morfometria de Vasos Sanguíneos

A contagem dos vasos para esta análise foi realizada predominantemente na camada da derme. No período experimental avaliado, os grupos tratados com laser (GL e GM+L) apresentaram maior quantidade de vasos em relação aos grupos GC e GM. Na comparação entre os grupos GC e GM nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada, assim como quando comparado somente os grupos tratados com laser (GL e GM+L). Porém, o grupo que apresentou a maior quantidade de vasos e foi, portanto estatisticamente diferente de todos os outros grupos (GC, GM e GM+L) foi o GL (Figura 20).

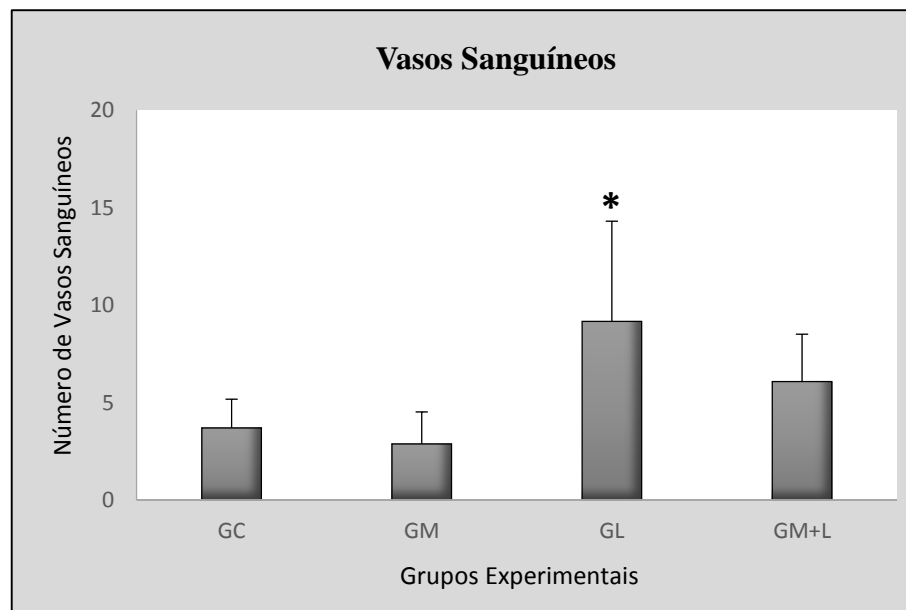


Figura 20. - Número de vasos sanguíneos. (CG) - grupo controle; (GM) - grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm², (GM+L) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana e LLLT com fluência de 25 J/cm². *p ≤ 0,05 versus GC e GM.

7.4.3 Birrefringência

A figura 21. mostra a análise da birrefringência das fibras de colágeno encontradas em cada grupo experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Todos os grupos apresentaram similaridade em relação à disposição de fibras de colágeno presente na camada da derme.

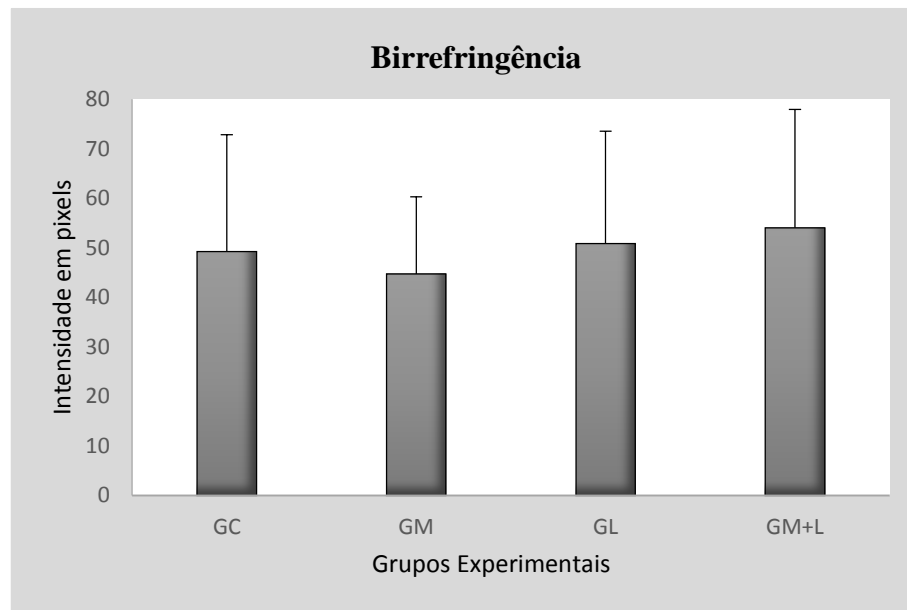


Figura 21. – Birrefringência de fibras de colágeno. GC: grupo controle; GM: grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; GL: grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm²; GM+L: grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT com fluência de 25 J/cm².

7.4.4 Análise Imunohistoquímica

A imunopressão da COX-2 revelou diferenças entre os grupos tratados e o GC. O GC apresentou imunopressão da COX-2 mais intensa quando comparado aos demais grupos avaliados (GM, GL e GM+L). Isto evidencia a maior quantidade de células inflamatórias neste grupo, que pode estar diretamente associada ao atraso no processo de cicatrização em relação aos demais grupos estudados. Por outro lado, o GM apresentou a imunopressão de forma leve diferentemente dos outros grupos experimentais (GC, GL e GM+L), que caracteriza o início da fase proliferativa e formação do tecido de granulação. Os grupos GL e GM+L apresentaram características diferentes quando comparados aos grupos GC e GM, porém similaridade nos resultados quando comparados entre si, revelando moderada imunopressão da COX-2, o que pode estar relacionada a transição entre a fase inflamatória e a fase proliferativa do processo de cicatrização (Figura 22.).

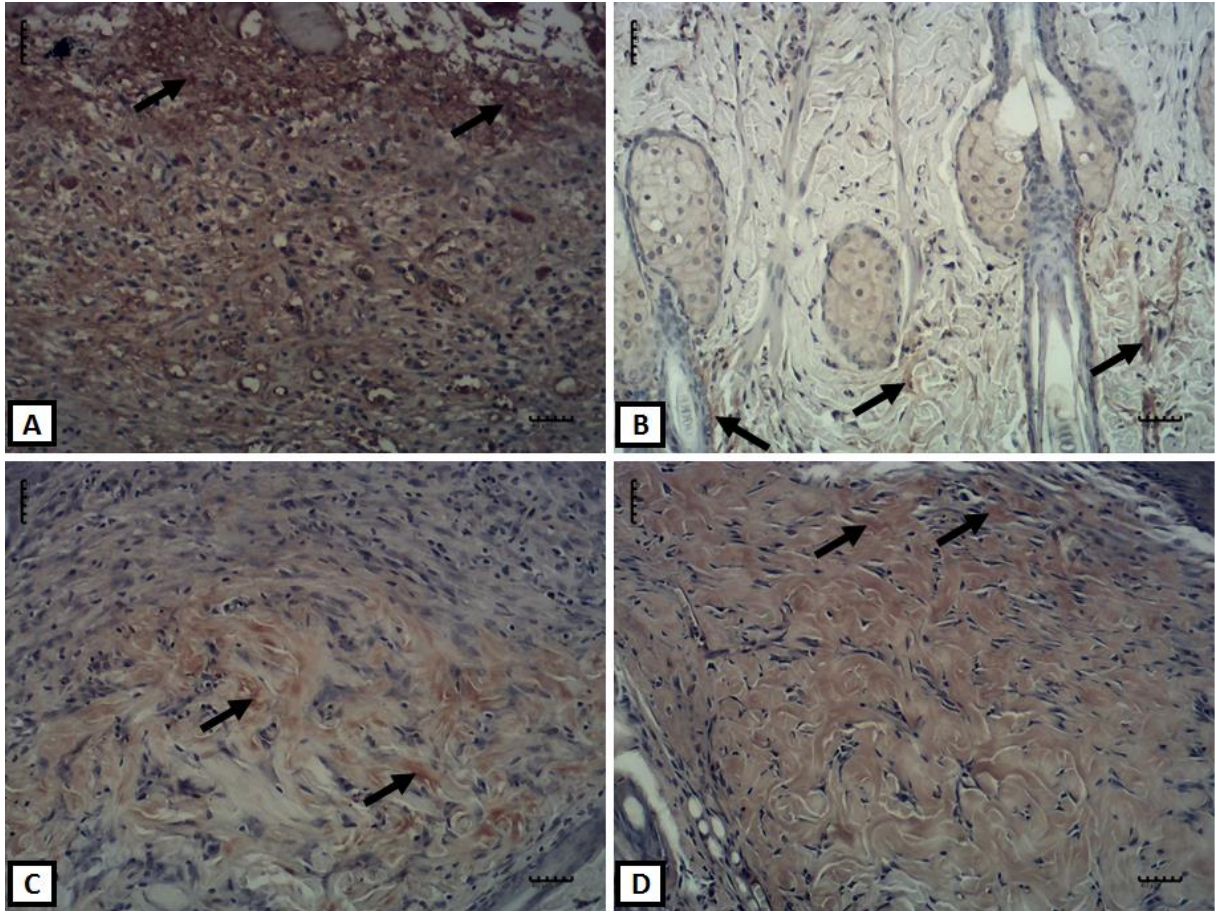


Figura 22. - Imunohistoquímica da COX-2: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (C) grupo tratado com LLLT; (D) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT. As setas indicam os locais de marcação na coloração marrom, que indicam a presença da COX-2 no tecido. (Coloração: Imunohistoquímica, Barra=40 μ m).

A análise semi-quantitativa da COX-2 representada na figura 23. confirmou os achados anteriores. O grupo GC apresentou a maior quantidade de COX-2 quando comparado aos demais grupos (GM, GL e GML), porém a diferença estatisticamente significativa só foi observada entre os grupos GC, GM e GL, dos quais GC apresentou a maior imunoexpressão. Na comparação entre o GC e o GML não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas na

comparação entre os grupos (GM e GL) e (GM e GML), onde o GM apresentou a menor imunoeexpressão.

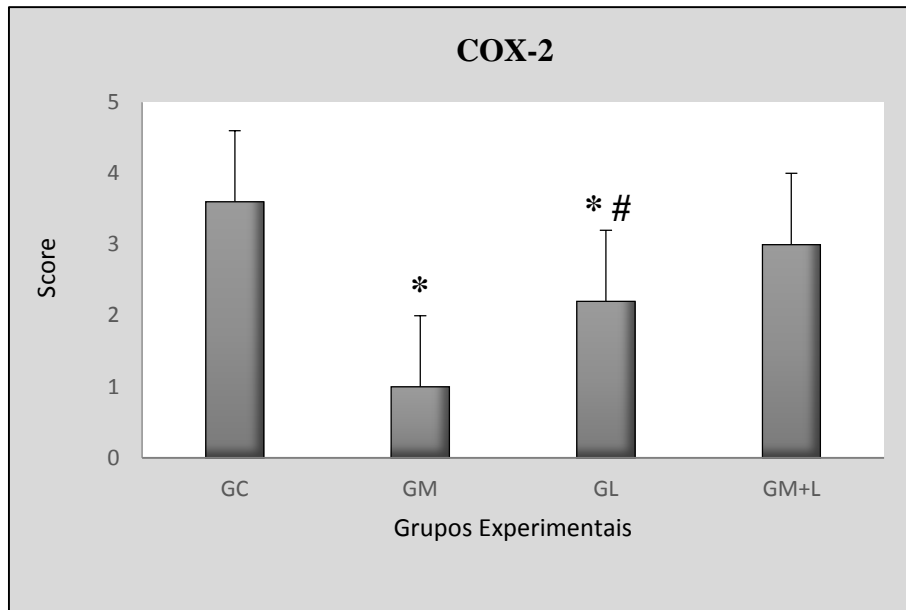


Figura 23. – Análise semi-quantitativa da COX-2 determinada através de escore. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com LLLL na fluência de 25 J/cm²; (GM+L) - grupo tratado com membranas de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². * p ≤ 0,05 versus GC, GL e GM+L; # p ≤ 0,05 versus GM e GM+L.

A imunoeexpressão do VEGF foi detectada tanto nas células presentes no citoplasma e nas paredes dos capilares. Foi possível observar que o GL foi o grupo que apresentou a maior expressão do VEGF. Os grupos GM e GM+L apresentaram similaridade nos resultados de expressão, apresentando-a de maneira moderada. O GC apresentou a menor expressão, quando comprado aos demais grupos avaliados, evidenciando com isso um atraso no processo de cicatrização (Figura 24).

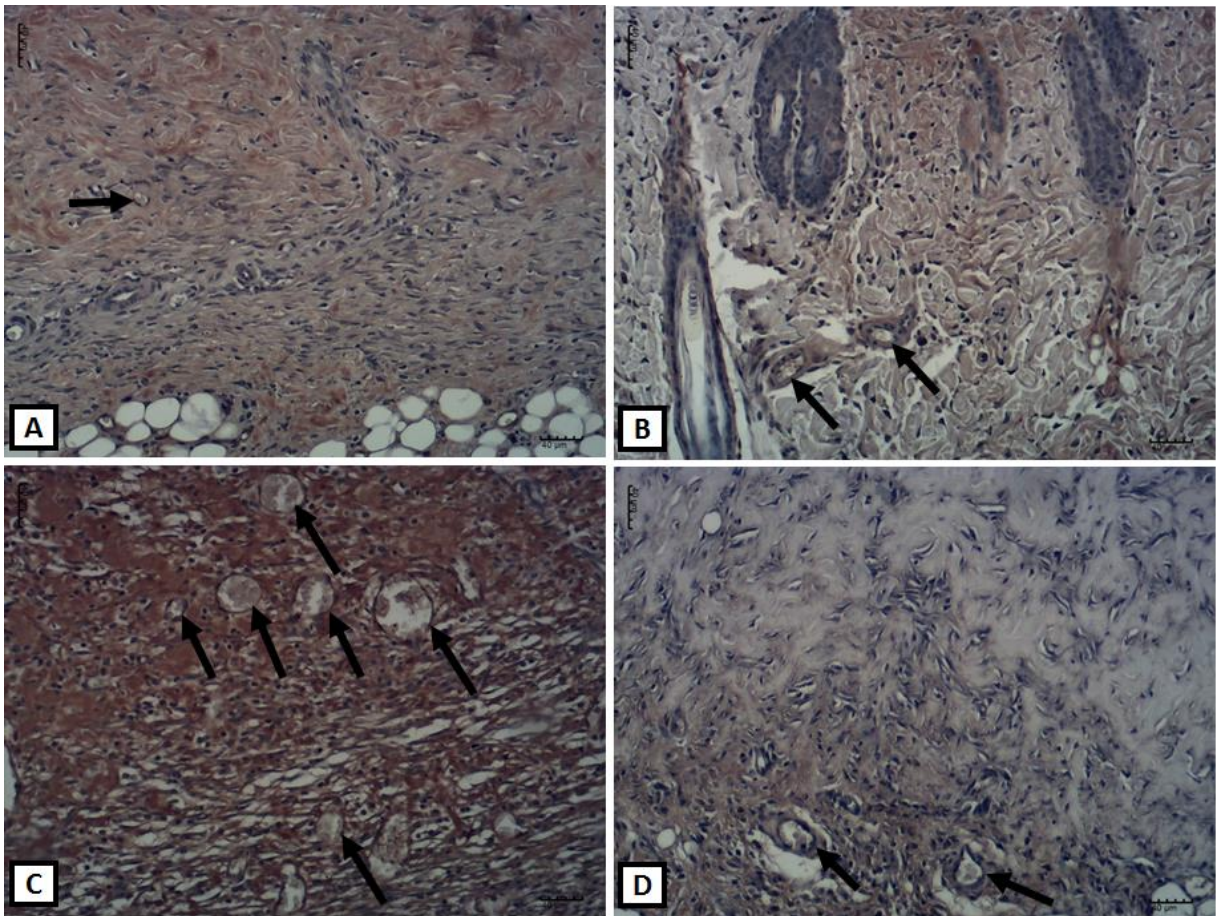


Figura 24. - Imunohistoquímica do VEGF: (A) grupo controle; (B) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura; (C) grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm^2 ; (D) grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm^2 . As setas indicam a imunomarcção dos vasos no tecido. (Coloração: HE, Barra= $40\mu\text{m}$).

Os resultados da análise semi-quantitativa do VEGF demonstrados na figura 25. confirmam os resultados achados na análise descritiva, que revelou uma diferença estatisticamente significativa da imunopressão do VEGF no GL, quando comparado ao GC e ao GM+L. Quando o GL foi comparado ao GM, não foram observadas diferenças estatísticas significativas, assim como quando comparamos os grupos GC, GM e o GM+L.

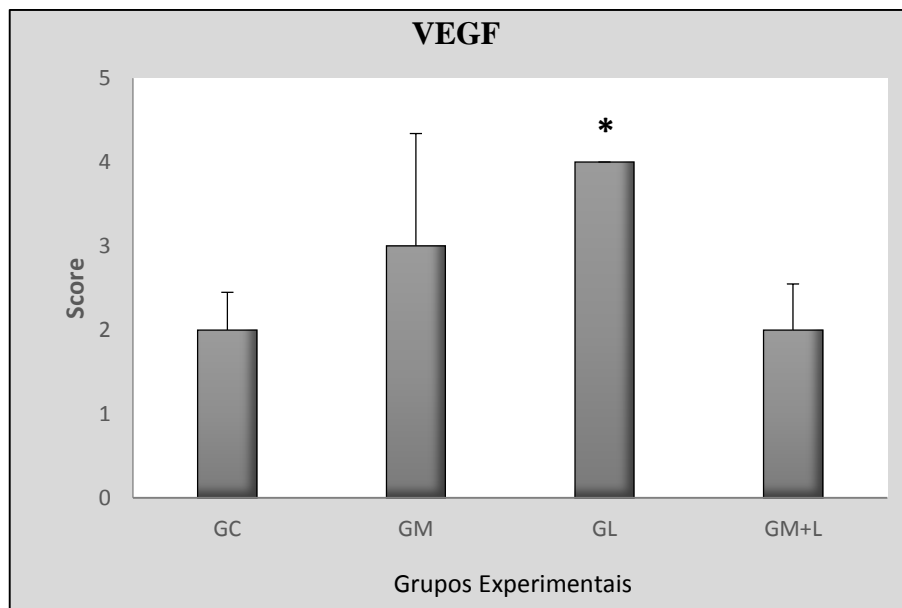


Figura 25. – Análise semi-quantitativa do VEGF determinada através de score. (GC) - grupo controle; (GM) - grupo membrana de celulose bacteriana pura; (GL) - grupo tratado com LLLT na fluência de 25 J/cm²; (GM+L) - grupo tratado com membrana de celulose bacteriana pura e LLLT na fluência de 25 J/cm². * $p \leq 0,05$ versus GC.

7.5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou dois métodos de tratamentos diferentes avaliados isoladamente e de forma associada em queimaduras de terceiro grau em ratos. Considerando que lesões extensas classificadas como de terceiro grau promovem dano tecidual significativo, é importante o uso de protocolos que associem propriedades de prevenção e proteção, encontrados nos curativos biológicos, com propriedades capazes de estimular o processo de cicatrização, como as encontradas com a aplicação da LLLT. A literatura atual mostra resultados benéficos da utilização da LLLT em queimaduras de terceiro grau, porém ainda são escassas as informações em relação ao uso das membranas de celulose bacteriana como curativos biológicos, bem como seu uso associado a LLLT.

Alguns dos aspectos considerados relevantes em cada fase do processo de cicatrização foram avaliados neste estudo. Os resultados demonstraram diferenças significativas em relação à evolução do processo de reparo tecidual apresentada em cada um dos grupos experimentais avaliados. Isto reforça, que cada tratamento proposto foi capaz de fornecer mecanismos e estímulos diferentes ao ambiente biológico da lesão que influenciam diretamente as características encontradas no tecido.

No décimo dia de tratamento, é esperado, no ambiente da lesão, evidências do início do processo proliferativo, seguido de formação de tecido de granulação e síntese de colágeno, que farão parte da estrutura do novo tecido. Além disso, a avaliação da espessura da epiderme, infiltrado inflamatório e imunexpressão da COX-2 podem contribuir para o entendimento da evolução do processo, uma vez que a presença desses fatores sugere atraso ou inadequada evolução da cicatrização (TRAJANO et al., 2015; LEE et al., 2003; REINKE;SORG, 2012; BUSUIOC et al., 2013; BLOMME et al., 2003; FUTAGAMI, et al., 2002; MARTIN, 1997).

Foi evidente em nosso estudo, que apesar de não possuir foco de contaminação, os resultados apresentados pelo GC seguiram este padrão, demonstrando ao décimo dia, tecido fibroso e espessa epiderme, que caracterizam o atraso no processo de cicatrização. Os grupos que receberam tratamento com membranas de celulose bacteriana e LLLT isoladamente bem como associados demonstraram características teciduais diferentes daquelas observadas no grupo controle, o que justifica que os tratamentos auxiliaram o processo de cicatrização.

Portanto, os resultados obtidos entre os grupos GL e GM+L, que receberam a aplicação da LLLT, apresentaram similaridade entre si, e estão de acordo com os achados de Fiório et al. (2013) e Rabelo et al. (2006), que avaliaram os efeitos moduladores da inflamação em lesões consideradas de espessura total, e observaram que a LLLT promoveu o estímulo pró-inflamatório, por recrutar um maior número de células no local da lesão. Cabe destacar que a quantidade do infiltrado inflamatório remete diretamente ao aumento da atividade de

neutrófilos e macrófagos, que contribuem com maior atividade fagocitária e liberação de fatores de crescimento, considerados fundamentais para a rápida resolução desta fase (MARTIN, 1997; REINKE; SORG, 2012).

Além disso, estudos que investigam a ação da LLLT no processo de cicatrização de feridas, enfatizam que a ação da luz laser, além de acelerar o processo de reparo tecidual por modular a resposta inflamatória (MEIRELES et al., 2008; RENNÓ et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013; SILVA et al., 2010), é capaz de atuar sobre fatores interligados ao restabelecimento vascular, relacionados diretamente ao processo de angiogênese (BOSSINI et al., 2009; DANTAS et al., 2011; COLOMBO et al., 2013; NÚÑEZ et al., 2013).

Nos casos de queimaduras de terceiro grau, trabalhos prévios como os de Colombo et al (2013) e Núñez et al. (2013) que utilizaram como tratamento a LLLT, demonstram tais efeitos positivos sobre o processo de angiogênese, comprovado através da presença do maior número de vasos sanguíneos no local da lesão. Em nosso estudo, os resultados encontrados em GL corroboram com os achados prévios, onde foi detectado não somente a maior quantidade de vasos, como também a maior expressão do fator VEGF, primordial ao estímulo da angiogênese.

É importante ressaltar que resultados similares a estes foram encontrados no GM+L, o que significa que a membrana de celulose bacteriana não interferiu na transmissão da quantidade de luz depositada no tecido, pois a expressão do fator VEGF foi igualmente manifestado. Porém, apesar de não ter sido encontrada diferenças estatisticamente significativas no número de vasos apresentados por estes dois grupos, é evidente que o GL foi o grupo que apresentou os melhores resultados neste sentido. Assim, os efeitos proporcionados pela LLLT como modulação da resposta inflamatória, estímulo a proliferação celular e restabelecimento da microcirculação local estão de acordo com os estudos de Rennó et al. (2009), porém contradizem outros como os de Núñez et al. (2013) e Fiório et al. (2014) que relatam encontrar

efeitos positivos relacionados a modulação da inflamação e síntese de colágeno, com a aplicação de valores de fluência significativamente menores.

Outro importante aspecto que deve ser ressaltado é a síntese das fibras de colágeno, pois qualquer problema detectado na síntese ou ausência de síntese, resulta em quadros de cicatrizes consideradas patológicas com alto conteúdo de tecido fibroso (PESSOLATO et al., 2011).

Apesar dos grupos GM, GL e GM+L aparentemente apresentarem uma melhor disposição das fibras de colágeno na derme, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na deposição e organização de fibras de colágeno entre os grupos experimentais avaliados neste estudo. Estes achados contradizem os trabalhos de (MEDRADO et al., 2003; NOVAES et al., 2014; GONÇALVES et al., 2013) que avaliaram a ação do LLLT no processo de reparo tecidual e observaram maior conteúdo de fibras de colágeno nos grupos tratados quando comparado ao controle. Meireles et al. (2008) avaliaram a ação da LLLT (660 nm) e 20J/cm² em queimaduras de terceiro grau em ratos diabéticos, e relataram aumento na síntese de colágeno. Porém, é necessário ressaltar que neste caso as condições metabólicas do animal, diferem daquelas apresentadas em nosso estudo, apesar do fato de que os parâmetros utilizados em ambos os estudos serem semelhantes.

Os resultados apresentados em nosso estudo pelo GM, corroboram os resultados prévios encontrados por Fu et al. (2012) e Portal; Clark; Levinson (2009), que avaliaram a ação da celulose bacteriana em feridas crônicas e observaram resultados satisfatórios com a aplicação do biomaterial, que proporcionou a diminuição do infiltrado inflamatório e consequente reepitelização, sem apresentar nenhum foco de infecção, quando comparado ao grupo controle e a outros métodos de tratamentos como curativos convencionais e enxertos. Assim, fica evidente que a membrana de celulose bacteriana foi um recurso biocompatível e atuante na proteção do ambiente da ferida, e isso contribuiu para o rápido progresso da fase inflamatória para a segunda fase do processo, a proliferação.

Diante os resultados apresentados, é pertinente ressaltar que apesar dos grupos tratados com a LLLT terem atuado como estimulador da resposta inflamatória favorecendo a migração celular local para a formação do tecido de granulação, o resultado encontrado no grupo tratado apenas com a membrana apresentou um padrão histológico compatível com um estágio mais avançado de reparo tecidual.

Como este é um estudo transversal, com a avaliação do processo em um único período experimental, não foi possível o acompanhamento de cada fase distinta decorrida durante o processo de cicatrização como um todo, e assim alguns aspectos de avaliação e de conclusão da sua evolução apresentam-se restritos. Com isso, fica evidente que há a necessidade de outros estudos que avaliem esta associação de tratamentos em diferentes períodos experimentais.

Assim, concluímos que os tratamentos propostos neste estudo demonstraram resultados positivos por estimular de maneiras diferentes o processo de cicatrização. Porém, na comparação dos tratamentos avaliados, apesar da LLLT ter apresentado os devidos efeitos pró-inflamatórios que modulam a resposta inflamatória e auxilia a regeneração tecidual, a ação isolada das membranas de celulose bacteriana como curativos biológicos demonstrou vantagens de tratamento, sendo biocompatível, seguro e eficaz, a nível de proteger e favorecer o ambiente celular e otimizar o tempo de tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos.

7.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEER, M. M.; AMIN, M. C. I. M.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047-1061, 2014.

ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332-336, 2014.

ARGIROVA, M.; HADJISKI, O.; VICTOROVA, A. Non-operative treatment of hypertrophic scars and keloids after burns in children. **Ann Burns Fire Disasters**, v. 19, n. 2, p. 80-7, 2006.

AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52, 2013.

AVILA, H. M.; SCHWARZ, S.; FELDMANN, E-V.; MANTAS, A.; BOMHARD, A. V.; GATENHOLM, P.; ROTTER, N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7423-7435, 2014.

BAXTER, R. M.; TIANHONG, D.; KIMBALL, J.; WNG, E.; HAMBLIN, M. R.; WIESMANN, W. P.; McCrthy, S. J.; BAKER, S. M. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 2, p. 340-348, 2013.

BENLIER, E.; ESKIOCAK, S.; PUYAN, F. O.; SIKAR, E. Y.; KANDULU, H.; OMURLU, I. K.; TOP, H.; AYGIT, A. C. Effects of lidocaine on reduction injury in a rat electrical burn model. **Annals of plastic surgery**, v.69, n.2, 2012.

BLOMME, E. A. G. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 211-223, 2003.

BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R. M.; RENNÓ, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 209-213, 2009.

BOSSINI, P. S.; RENNÓ, A. C. M.; RIBEIRO, D. A.; FANGEL, R.; RIBEIRO, A. C.; LAHOZ, M. A.; PARIZOTTO, N. A. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 2, p. 136-142, 2012.

BRAZIULIS, E.; DIEZI, M.; BIEDERMANN, T.; PONTIGGIA, L.; SCHMUCKI, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; LUGINBUHL, J.; SCHIESTL, C.; MEULI, M.; REICHMANN, E. Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes. **Tissue Engineering Part C-Methods**, v. 18, n. 6, p. 464-474, 2012.

BUSUIOC, C. J.; MOGOSANU, G. D.; POPESCU, F. C.; LASCAR, I.; PARVANESCU, H.; MOGOANTA, L. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: histological and immunohistochemical study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 54, n. 1, p. 163-171, 2013.

CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. **J Biol Eng**, v. 3, p. 12, 2009.

COLOMBO, F.; VALENÇA NETO, A. A. P.; SOUSA, A. P. C.; MARCHIONNI, A. M. T.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308-312, 2013-07, 2013.

CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROW, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAÚJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 1, p. 51-59, 2011.

DE MORAES, J. M.; MENDONÇA, D. E. O.; MOURA, V. B. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; AFONSO, C. L.; VINAUD, M. C.; BACHION, M. M.; LINO JR., R. S. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1169-1176, 2013.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, p. 265, 2014.

EZZATI, A.; BAYAT, M.; KHOSHVAGHTI, A. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 46, n. 4, p. 543-554, 2009.

FIORIO, F. B.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 313-319, 2014.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

GARAVELLO-FRELTAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; da CRUZ-HOFLING, M. A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 70, n. 2, p. 81-89, 2003.

GOLDYNE, M. E. Cyclooxygenase isoforms in human skin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 63, n. 1-2, p. 15-23, 2000.

GONCALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; MORAES, B.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G.; PINTO, M. V. M.; MATTA, S. L. P. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383-390, 2013.

HALLORAN, C. M.; SLAVIN, J. P. Pathophysiology of wound healing. **Surgery**, 2002.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Natural Products and Molecular Therapy**, v. 1056, p. 486-493, 2005.

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159-160, 2010.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; KAWASHIRO, K.; SAKANAKA, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 860-870, 2006.

KNABL, J. S.; BAUER, W.; ANDEL, H.; SCHWENDENWEIN, I.; DADO, P.F.; MITTLBOCK, M.; ROMER, W.; CHOI, M. S. S.; HORVAT, R.; MEISSEL, G.; FREY, M. M. Progression of burn wound depth by systemical application of a vasoconstrictor: an experimental study with a new rabbit model. **Burns**, v. 25, n. 8, p. 715-721, 1999.

KO, W. J.; NA, Y. C.; SUH, B. S.; KIM, H. A.; HEO, W. H.; CHOI, G. H.; LEE, S. U. The effects of topical agent (kelo-cote or contractubex) massage on the thickness of post-burn scar tissue formed in rats. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 6, p. 697-704, 2013.

LABUS, W.; KAWECKI, M.; NOWAK, M. The role of tissue engineering in the treatment of burn wounds. **Pol Przegl Chir**, v. 84, n. 3, p. 167-71, 2012.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELORICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003.

MARTIN, P. Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

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

MEIRELES, G. C. S.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 2008.

MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, p. 237-239, 2013.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C.; LEITE, J. P.; MATTA, S. L. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2, p. 138-146, 2014.

NUNEZ, S. C.; FRANÇA, C. M.; SILVA, D. F. T.; NOGUEIRA, G. E. C.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633-641, 2013.

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1087-1100, 2011.

PESSOLATO, A. G. T.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A. F.; CARVALHO, A. F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

PORTAL, O.; CLARK, W. A.; LEVINSON, D. J. Microbial Cellulose Wound Dressing in the Treatment of Nonhealing Lower Extremity Ulcers. **Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 21, n. 1, p. 1-3, 2009.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RENNO, A. C. M.; IWAMA, A. M.; SHIMA, P.; FERNANDES, K. R.; CARVALHO, J. G.; OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D. A. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, n. 5, p. 237-242, 2011.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int J Biomater**, v. 23: 2253-2266, 2011.

SCHWACHA, M. G.; THOBE, B. M.; DANIEL, T.; HUBBARD, W. J. Impact of thermal injury on wound infiltration and the dermal inflammatory response. *Journal Surg. Res.* 158(1), 2010.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2010.

SOTO-PANTOJA, D. R.; SHIH, H. B.; MAXHIMER, J. B.; COOK, K. L.; GHOSH, A.; ISENBERG, J. S.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin-1 and CD47 signaling regulate healing of thermal injury in mice. **Matrix Biology**, v. 37, p. 25-34, 2014.

SOUZA, C. M. C. O.; MESQUITA, L. A. F.; IRIODA, A. C.; FRANCISCO, J. C.; SOUZA, C. F.; GUARITA-SOUZA, L. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; CARVALHO, K. A. T. Regeneration of skin tissue promoted by mesenchymal stem cells seeded in nanostructures membrane. **Transplantation Proceeding**, 46, 1882-1886, 2014.

SUN, G.; ZHANG, X.; SHEN, YU-I.; SEBASTIAN, R.; DICKISSON, L. E.; TALBOT, K. F.; REINBLAT, M.; STEENBERGEN, C.; HARMON, J. W.; GERECHE, S. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 20976-20981, 2011.

TRAJANO, E. T. L.; TRAJANO, L. A.; SILVA, M. A. S.; VENTER, N. G.; PORTO, L. C.; FONSECA, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1297-1304, 2015.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4162-4168, 2011.

VASHEGHANI, M. M.; BAYAT, M.; REZAEI, F.; BAYAT, A.; KARIMIPOUR, M. Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2008.

ZHANG, Q.; FONG, C. C.; ZHANG, Y.; TZANG, Y.; FONG, W. F.; YANG, M.. cDNA microarray analysis of the differentially expressed genes involved in murine pre-osteoclast RAW264.7 cells proliferation stimulated by dexamethasone. **Life Sciences**, v. 82, n. 3-4, p. 135-148, 2008.

PARTE III

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou características relevantes sobre as duas abordagens de tratamentos utilizadas (membranas de celulose bacteriana e LLLT), que sugerem características positivas de atuação no ambiente celular e, conseqüentemente, no processo de cicatrização. Diante das análises realizadas ficou evidente que a LLLT promoveu a modulação da resposta inflamatória, o que está diretamente relacionado ao estímulo da migração celular, que auxilia a rápida resolução desta fase com melhor restabelecimento da microcirculação local. Porém, na comparação das características morfológicas apresentadas pelos tecidos nos grupos que receberam tais tratamentos, foi possível concluir que o GM obteve o melhor resultado em relação a evolução do processo de cicatrização. É importante ressaltar, que além dos aspectos positivos encontrados no estudo, duas importantes limitações foram diagnosticadas. A primeira é relacionada a lesão, que apesar de apresentar profundidade ideal e ser classificada como queimadura de terceiro grau, tinha pequena extensão, devido à preocupação ética com o uso do animal. A segunda limitação deve-se ao fato de que o trabalho foi elaborado de forma a ser um estudo transversal, com avaliação pontual em apenas uma das fases que compõem o processo de cicatrização, e assim sendo, não é possível descrever e/ou avaliar a sequência de todos os eventos biológicos pertencentes ao processo.

Porém, cabe ressaltar que tais limitações não afetam diretamente os achados, apenas expõem a necessidade de investigações futuras que explorem com maior detalhamento as fases do processo, bem como a ação de tais tratamentos, que podem ser evidenciados com os nossos resultados.

Assim, com base nos resultados obtidos nos três estudos apresentados acima foi possível concluir:

- A aplicação das membranas de celulose bacteriana em seu estado puro e acrescida de lidocaína atuaram como efetivos curativos biológicos capazes de proteger o ambiente da lesão e auxiliar o processo de cicatrização

- A comparação de fluências e energias diferentes apresentadas neste trabalho foi importante para elucidar que a maior fluência e portanto, maior energia depositada no tecido foi mais eficaz em estimular as células pertencentes ao processo de cicatrização contribuindo assim para um melhor aspecto do processo de cicatrização

- A associação dos tratamentos propostos (membranas de celulose bacteriana pura e LLLT) demonstrou resultados parecidos aos encontrados somente com o uso da LLLT, porém apresentou diferenças na morfologia apresentada pelo tecido quando comparada somente ao tratamento com as membranas

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Quanto as perspectivas futuras, fica evidente a necessidade de estudos futuros cuja construção seja longitudinal, e direcione sua avaliação sobre cada fase do processo de cicatrização individualmente, promovendo assim respostas referentes à evolução do processo como um todo. Além disso, estes trabalhos devem explorar tais tratamentos (membranas de celulose bacteriana e LLLT) em lesões mais extensas, que simulem uma cicatrização crítica. Com isso, será possível desenvolver um melhor entendimento do comportamento e evolução do processo de cicatrização como um todo em queimaduras de terceiro grau em ratos, bem como o melhor momento de intervir utilizando estes dois tipos de tratamento.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEER, M. M.; AMIN, M. C. I. M.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047-1061, 2014.

ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332-336, 2014.

ANDRADE, A.G.; LIMA, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B.; Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: Uma visão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, 9(1):21-30, 2010.

ARGIROVA, M.; HADJISKI, O.; VICTOROVA, A. Non-operative treatment of hypertrophic scars and keloids after burns in children. **Ann Burns Fire Disasters**, v. 19, n. 2, p. 80-7, 2006.

AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 41-52, 2013.

AVILA, H. M.; SCHWARZ, S.; FELDMANN, E-V.; MANTAS, A.; BOMHARD, A. V.; GATENHOLM, P.; ROTTER, N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7423-7435, 2014.

BAXTER, R. M.; TIANHONG, D.; KIMBALL, J.; WNG, E.; HAMBLIN, M. R.; WIESMANN, W. P.; McCrthy, S. J.; BAKER, S. M. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 2, p. 340-348, 2013.

BENLIER, E.; ESKIOCAK, S.; PUYAN, F. O.; SIKAR, E. Y.; KANDULU, H.; OMURLU, I. K.; TOP, H.; AYGIT, A. C. Effects of lidocaine on reduction injury in a rat electrical burn model. **Annals of plastic surgery**, v.69, n.2, 2012.

BLOMME, E. A. G.; CHINN, K. S.; HARDY, M. M.; CASLER, J. J.; KIM, S. H.; OPSAHL, A. C.; HALL, W. A.; TRAJKOVIC, D.; KLAN, K. N.; TRIPP, C. S. Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *British Journal of Dermatology*, 148: 211-223, 2003.

BOSSINI, P. S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R. M.; RENNÓ, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. ***Lasers in Medical Science***, v. 24, n. 2, p. 209-213, 2009.

BOSSINI, P. S.; RENNÓ, A. C. M.; RIBEIRO, D. A.; FANGEL, R.; RIBEIRO, A. C.; LAHOZ, M. A.; PARIZOTTO, N. A. Low level laser therapy (830 nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. ***Experimental Gerontology***, v. 47, n. 2, p. 136-142, 2012.

BRAZIULIS, E.; DIEZI, M.; BIEDERMANN, T.; PONTIGGIA, L.; SCHMUCKI, M.; HARTMANN-FRITSCH, F.; LUGINBUHL, J.; SCHIESTL, C.; MEULI, M.; REICHMANN, E. Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides an Ideal Matrix for Clinically Applicable Skin Substitutes. ***Tissue Engineering Part C-Methods***, v. 18, n. 6, p. 464-474, 2012.

BUSUIOC, C. J.; MOGOSANU, G. D.; POPESCU, F. C.; LASCAR, I.; PARVANESCU, H.; MOGOANTA, L. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: histological and immunohistochemical study. ***Romanian Journal of Morphology and Embryology***, v. 54, n. 1, p. 163-171, 2013.

CAMPELO, A. P. B.; CAMPELO, M. W. S.; BRITTO, G. A. C.; AYALA, A. P.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cirúrgica brasileira*, v. 26, 2011.

CHEN, X. L.; LIANG, X.; SUN, L.; WANG, F.; LIU, S.; WANG, Y. J. Microskin autografting in the treatment of burns over 70% of total body surface area: 14 years of clinical experience. ***Burns***, 37, 2011.

CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. ***J Biol Eng***, v. 3, p. 12, 2009.

COLOMBO, F.; VALENÇA NETO, A. A. P.; SOUSA, A. P. C.; MARCHIONNI, A. M. T.; PINHEIRO, A. L. B.; REIS, S. R. A. Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on

Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 308-312, 2013-07, 2013.

CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROW, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAÚJO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 1, p. 51-59, 2011.

DE MORAES, J. M.; MENDONÇA, D. E. O.; MOURA, V. B. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; AFONSO, C. L.; VINAUD, M. C.; BACHION, M. M.; LINO JR., R. S. Anti-inflammatory effect of low-intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 4, p. 1169-1176, 2013.

EZZATI, A.; BAYAT, M.; KHOSHVAGHTI, A. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 46, n. 4, p. 543-554, 2009.

FIORIO, F. B.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 313-319, 2014.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

FUTAGAMI, A.; ISHIZAKI, M.; FUKUDA, Y.; KAWANA, S.; YAMANAKA, N. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 11, p. 1503-1513, 2002.

GARAVELLO-FRELTAS, I.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO, P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; da CRUZ-HOFLING, M. A. Low-power laser irradiation improves

histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 70, n. 2, p. 81-89, 2003.

GOLDYNE, M. E. Cyclooxygenase isoforms in human skin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 63, n. 1-2, p. 15-23, 2000.

GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; CUPERTINO, M. C.; MORAES, B.; LEITE, J. P. V.; PELUZIO, M. C. G.; PINTO, M. V. M.; MATTA, S. L. P. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383-390, 2013.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Natural Products and Molecular Therapy**, v. 1056, p. 486-493, 2005.

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159-160, 2010.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; KAWASHIRO, K.; SAKANAKA, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 860-870, 2006.

KNABL, J. S.; BAUER, W.; ANDEL, H.; SCHWENDENWEIN, I.; DADO, P.F.; MITTLBOCK, M.; ROMER, W.; CHOI, M. S. S.; HORVAT, R.; MEISSEL, G.; FREY, M. M. Progression of burn wound depth by systemical application of a vasoconstrictor: an experimental study with a new rabbit model. **Burns**, v. 25, n. 8, p. 715-721, 1999.

KO, W. J.; NA, Y. C.; SUH, B. S.; KIM, H. A.; HEO, W. H.; CHOI, G. H.; LEE, S. U. The effects of topical agent (kelo-cote or contractubex) massage on the thickness of post-burn scar tissue formed in rats. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 6, p. 697-704, 2013.

LABUS, W.; KAWECKI, M.; NOWAK, M. The role of tissue engineering in the treatment of burn wounds. **Pol Przegl Chir**, v. 84, n. 3, p. 167-71, 2012.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELORICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003.

MARTIN, P. Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

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

MEIRELES, G. C. S.; SANTOS, J. N.; CHAGAS, P. O.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 47-54, 2008.

MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, p. 237-239, 2013.

MONTES, S. F.; BARBOSA, M. H.; NETO, A. L. S. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um hospital de ensino. **Revista Escolar de Enfermagem USP**, 45(2):369-73, 2011.

MUANGMAN, P.; OPASANON, S.; SUPAPARN, S.; THANGTHED, O. Efficiency microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, 3, 16-19, 2011.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C.; LEITE, J. P.; MATTA, S. L. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2, p. 138-146, 2014.

NUNEZ, S. C.; FRANÇA, C. M.; SILVA, D. F. T.; NOGUEIRA, G. E. C.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 633-641, 2013.

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1087-1100, 2011.

PESSOLATO, A. G. T.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; MANÇANARES, C. A. F.; CARVALHO, A. F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

PINTO, K. N. Z.; TIM, C. R.; CROVACE, M. C.; MATSUMOTO, M. A.; PARIZOTTO, N. A.; ZANOTTO, E. D.; PEITI, O.; RENNO, A. C. M. Effects of Biosilicate scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 6, 2013.

POPESCU, F. C.; BUSUIOC, C. J.; MOGOSANU, G. D.; POP, O. T.; PARVANESCU, H.; LASCAR, I.; NICOLAE, C. I.; MOGOANTA, L. Pericytes and myofibroblasts reaction in experimental thermal third degree skin burns. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, 53 (3): 1011-1017, 2011.

PORTAL, O.; CLARK, W. A.; LEVINSON, D. J. Microbial Cellulose Wound Dressing in the Treatment of Nonhealing Lower Extremity Ulcers. **Wounds-a Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 21, n. 1, p. 1-3, 2009.

RENNO, A. C. M.; IWAMA, A. M.; SHIMA, P.; FERNANDES, K. R.; CARVALHO, J. G.; OLIVEIRA, P.; RIBEIRO, D. A. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 13, n. 5, p. 237-242, 2011.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RAMBO, C.S. M.; SILVA JR., J. A.; ANDREY, J. S.; LIGEIRO, A. P.; VIEIRA, R. P.; ALBERTINI, R.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. **Laser Medicine Science**, 29:1723-1733, 2014.

ROWAN, M. P.; CANCIO, C. L.; ELSTER, E. A.; DAVID, M. B.; ROE, L. F.; NATESAN, S.; CHAN, R. K.; CHRISTY, R. J.; CHUNG, K. K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical Care**, 19:243, 2015.

SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; TEIXEIRA, L. N.; FRANCHI, L. P.; SANTOS, R. A.; GASPAR, A. M. M.; OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L.; TAKAHASHI, C. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int J Biomater**, v. 23: 2253-2266, 2011.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, 2010.

SOTO-PANTOJA, D. R.; SHIH, H. B.; MAXHIMER, J. B.; COOK, K. L.; GHOSH, A.; ISENBERG, J. S.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin-1 and CD47 signaling regulate healing of thermal injury in mice. **Matrix Biology**, v. 37, p. 25-34, 2014.

SUN, G.; ZHANG, X.; SHEN, YU-I.; SEBASTIAN, R.; DICKISSON, L. E.; TALBOT, K. F.; REINBLAT, M.; STEENBERGEN, C.; HARMON, J. W.; GERECHT, S. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 20976-20981, 2011.

TIM, C. R.; PINTO, K. N. Z.; ROSSI, B. R. O.; FERNANDES, K.; MATSUMOTO, M. A.; PARIZOTTO, N. A.; RENNO, A. C. M. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Laser Medicine Science**, 2013.

TIWARI, V. K. Burn wound: How it differs from other wounds?. **Indian Journal of Plastic Surgery**, 45(2):364-373; 2012.

TRAJANO, E. T. L.; TRAJANO, L. A.; SILVA, M. A. S.; VENTER, N. G.; PORTO, L. C.; FONSECA, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1297-1304, 2015.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4162-4168, 2011.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser irradiation. **Biochemistry**, v.69, p.81-90, 2004.

ZHANG, Q.; FONG, C. C.; ZHANG, Y.; TZANG, Y.; FONG, W. F.; YANG, M.. cDNA microarray analysis of the differentially expressed genes involved in murine pre-osteoclast RAW264.7 cells proliferation stimulated by dexamethasone. **Life Sciences**, v. 82, n. 3-4, p. 135-148, 2008.

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
nº 022/2013

Protocolo nº. 022/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Efeitos da terapia laser de baixa intensidade e de membranas de celulose bacteriana no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos*", submetido pela pesquisadora *Patricia Brassolatti*.

São Carlos, 11 de setembro de 2013.

Azair Liane Matos do Canto de Souza

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B
LAUDO PATOLÓGICO



PATOLOGIA CIRÚRGICA E CITOPATOLOGIA

Rua Conselheiro João Alfredo, 276 | Telefones/Fax: +55 16 3372-9245 | 3415-2306 | 3415-2316
CEP 13561-110 | São Carlos - SP | e-mail: iapsaocarlos@gmail.com

Dra. Elizete Lopes Guilherme
CRM 42.469

Dr. Michel Antonio Kiyota Moutinho
CRM 105.335

Dr. Richard Augusto Ribeiro
CRM 125.686

LAUDO HISTOPATOLÓGICO

Material: Pele de rato. Foram recebidas 3 (três) amostras identificadas como R¹, R² e R³.

Cada amostra possui 3 lâminas coradas pela hematoxilina-eosina, numeradas como 1, 3 e 5 ; 2 lâminas coradas pelo picro-sírius e numeradas como 2 e 4.

Objetivo: verificar o nível da lesão provocada por queimadura térmica em pele do dorso de rato. Na amostra R¹ foi utilizada a temperatura de 150°C e nas amostras R² e R³ 170°C.

As queimaduras são graduadas em 1° grau, 2° grau e 3° grau conforme o nível de acometimento da lesão na pele:

1° grau: Ocorre necrose de coagulação na epiderme superficial com preservação da epiderme inferior, mantendo a camada basal intacta.

2° grau: Presença de bolha subepidérmica, necrose da epiderme com comprometimento parcial dos anexos, ficando intacta sua porção inferior e necrose parcial da derme. Em estágio mais avançado há área de inflamação entre a porção lesada e a porção sã.

3° grau: Há necrose total da derme com destruição de todos anexos. A necrose de coagulação pode se estender ao tecido subcutâneo e muscular.

Avaliação das amostras enviadas:

Amostra R¹: As lâminas identificadas como 1, 2 e 3 apresentam o mesmo padrão de lesão.

- Necrose total da epiderme e seus anexos.
- Presença de bolha intra e subepidérmica.
- Necrose de derme superficial, intermediária e profunda.
- Vasocongestão na derme profunda.
- Coloração de picro-sírius nas lâminas 2 e 4 demonstra necrose de coagulação da derme corada em vermelho .

Amostra R²: As lâminas identificadas como 1, 2 e 3 apresentam o mesmo padrão de lesão.

- Necrose total da epiderme e seus anexos.
- Presença de bolha intra e subepidérmica.
- Necrose de derme superficial, intermediária e profunda.
- Vasocongestão na derme profunda.



PATOLOGIA CIRÚRGICA E CITOPATOLOGIA

Rua Conselheiro João Alfredo, 276 | Telefones/Fax: +55 16 3372-9245 | 3415-2306 | 3415-2316
CEP 13561-110 | São Carlos - SP | e-mail: iapsaocarlos@gmail.com

Dra. Elizete Lopes Guilherme
CRM 42.469

Dr. Michel Antonio Kiyota Moutinho
CRM 105.335

Dr. Richard Augusto Ribeiro
CRM 125.686

- Coloração de picro-sírius nas lâminas 2 e 4 demonstra necrose de coagulação da derme corada em vermelho .

Amostra R³: As lâminas identificadas como 1, 2 e 3 apresentam o mesmo padrão de lesão.

- Necrose total da epiderme e seus anexos.
- Presença de bolha intra e subepidérmica.
- Necrose de derme superficial, intermediária e profunda.
- Vasocongestão na derme profunda.
- Coloração de picro-sírius nas lâminas 2 e 4 demonstra necrose de coagulação da derme corada em vermelho .

CONCLUSÃO:

As três amostras R¹, R² e R³ apresentam o mesmo nível de lesão, classificadas como QUEIMADURAS GRAU III.

Dra. Elizete Lopes Guilherme

Médica - Patologista

ANEXO C
SUBMISSÃO DO ESTUDO I

E-mail recebido em 10/07/2015 do periódico “*Journal of Tissue Viability*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Biological dressings bacterial cellulose-based for the treatment on third-degree burns in rats*” (ESTUDO I)

A manuscript number has been assigned: JTV-D-15-00045


Entrada x



 **Journal of Tissue Viability** <jtv@elsevier.com>
para mim, pattyb-fisio

10 de jul ☆



 inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Ms. Ref. No.: JTV-D-15-00045

Title: Biological dressings bacterial cellulose-based for the treatment on third-degree burns in rats.
Journal of Tissue Viability

Dear Ms. Patricia Brassolatti,

Your submission "Biological dressings bacterial cellulose-based for the treatment on third-degree burns in rats." has been assigned manuscript number JTV-D-15-00045.

Below are the instructions on how to track your submission:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jtv/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]




Thank you for submitting your work to Journal of Tissue Viability.




Kind regards,


Journal of Tissue Viability


ANEXO D
SUBMISSÃO DO ESTUDO II

E-mail recebido em 05/07/2015 do periódico “*Microscopy Research and Techniques*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats*” (ESTUDO II)

MRT-15-189 successfully submitted  Entrada x  

 **jemt@wiley.com** por jemt@wiley.com por manuscriptcentral.com 5 de jul ☆  

para mim 

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

05-Jul-2015

Dear Ms. Brassolatti,

Your manuscript entitled "Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Microscopy Research and Technique*.

Your manuscript number is MRT-15-189. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/mrt>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to *Microscopy Research and Technique*.


Sincerely,
Microscopy Research and Technique Editorial Office

ANEXO E
SUBMISSÃO DO ESTUDO III

E-mail recebido em 14/10/2015 do periódico “*Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Effects of associated bacterial cellulose membrane and low-level laser therapy on third-degree burn wound healing in rats*” (ESTUDO III)

JOURNAL OF APPLIED BIOMATERIALS AND FUNCTIONAL MATERIALS | Submission
confirmation: JABFM-D-15-00162



 **JABFM Editorial Office** <em@editorialmanager.com>
para mim

09:56 (Há 3 minutos) ☆



 inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr Brassolatti,

This is to confirm receipt of your manuscript as follows:

JABFM-D-15-00162

"EFFECTS OF ASSOCIATED BACTERIAL CELLULOSE MEMBRANE AND LOW-LEVEL LASER THERAPY ON THIRD-DEGREE BURN WOUND HEALING IN RATS"

Corresponding Author: Dr Patricia Brassolatti

Include the manuscript number in all correspondence with the Journal.

You may check on the progress of your submission by logging in to <http://jabfm.edmgr.com/> with your username (pattyb) and password (brassolatt754777).

Thank you for submitting this article for consideration to the JOURNAL OF APPLIED BIOMATERIALS AND FUNCTIONAL MATERIALS

With kind regards

Editorial Office
Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials