

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE ODONTOLOGIA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE REVESTIMENTOS CUTÂNEOS
SINTÉTICOS DE QUITOSANA/ALGINATO DE SÓDIO E LASER
DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE
QUEIMADURAS EM MODELO MURINO**

Vítor Garcia Moreno de Oliveira

ARACAJU/SE
MAIO/2009

UNIVERSIDADE TIRADENTES
CURSO DE ODONTOLOGIA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE REVESTIMENTOS CUTÂNEOS
SINTÉTICOS DE QUITOSANA/ALGINATO DE SÓDIO E LASER
DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE
QUEIMADURAS EM MODELO MURINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Coordenação do Curso de Odontologia da
Universidade Tiradentes com parte dos requisitos
para obtenção do grau de bacharel em
odontologia.

Vítor Garcia Moreno de Oliveira
Prof.Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Jr.

ARACAJU/SE
MAIO/2009

VITOR GARCIA MORENO DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE REVESTIMENTOS CUTÂNEOS SINTÉTICOS
DE QUITOSANA/ALGINATO DE SÓDIO E LASER DE BAIXA
POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM
MODELO MURINO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Coordenação do
Curso de Odontologia da
Universidade Tiradentes com parte
dos requisitos para obtenção do
grau de bacharel em odontologia.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

PROF.DR. RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JR.
ORIENTADOR/PRESIDENTE DA BANCA

MARIA DE FÁTIMA BATISTA DE MELO
1º EXAMINADOR

RAIMUNDO SILVA ROCHA
2º EXAMINADOR

"A liberdade de procurar e dizer a verdade é um elemento essencial da comunicação humana, não só com relação aos fatos e à informação, mas também e especialmente sobre a natureza e destino da pessoa humana, com respeito à sociedade e o bem comum, com respeito à nossa relação com Deus."

Papa João Paulo II

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meus passos diariamente e de todos ao meu redor.

Agradeço aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da caminhada, me apoiando em qualquer decisão que eu tomasse, principalmente nos piores momentos.

A minha namorada Marinalva por caminhar junto a mim e me ajudar no possível e impossível.

Agradeço aos meus familiares por me apoiarem.

Ao meu orientador Professor Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Jr. por ver meu potencial e apostar no meu trabalho me adotando como estagiário e amigo.

Aos Amigos e colegas que sempre ajudaram em todos os momentos.

Obrigado a todos!

ASSOCIAÇÃO ENTRE REVESTIMENTOS CUTÂNEOS SINTÉTICOS DE QUITOSANA/ALGINATO DE SÓDIO E LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS EM MODELO MURINO

Vitor Garcia Moreno de OLIVEIRA

Ricardo Luiz Cavalcanti de ALBUQUERQUE JÚNIOR

Graduando em Odontologia. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq).

Universidade Tiradentes. Aracaju/SE.

Doutor em Patologia oral. Programa de Pós-Graduação em Saúde Ambiente.

Universidade Tiradentes. Aracaju/SE.

Resumo:

Polímeros naturais de diferentes atividades biológicas vêm sendo empregados como filmes para revestimento dérmico no intuito de melhorar a cicatrização. A irradiação Laser de baixa potência (LLLT), por sua vez, apresenta propriedades bioestimulatórias aparentemente capazes de acelerar o reparo cicatricial. Assim, o propósito deste estudo foi avaliar se o processo de reparo de queimaduras pode ser otimizado com a associação entre filmes poliméricos de revestimento dérmico composto de quitosana /alginato de sódio e de hemicelulose com LLLT. Assim, foram realizadas queimaduras em 60 ratos separados em 6 grupos : CTR – controle; HC – tratado com filmes de hemicelulose; QA – tratado com filme de quitosana/alginato; LLLT – tratado com laser; HC/LLLT – tratado com associação entre filme de hemicelulose e laser; QA/LLLT – tratado com associação entre filme de quitosana/alginato e laser. A LLLT foi procedida a $\lambda 780$ nm, $5J/cm^2$, 40 mW, 00.04 mm a cada 48 horas por 7 dias. Após 08 e 14 dias, 06 animais de cada grupo foram eutanasiados, cicatriz foi removida e processada histologicamente. No oitavo dia, os grupos dermoprottegidos e/ou irradiados, houve substituição da reação inflamatória aguda por reação de granulação, que se mostrou mais madura em QA/LLLT que nos demais. No décimo quarto dia, observou-se redução substancial do infiltrado inflamatório em todos os grupos, mas foi praticamente ausente em QA/LLLT. A associação entre laser de baixa potência e filmes de quitosana e alginato de sódio também promoveu substituição mais rápida do colágeno tipo III por tipo I, além de estimular a melhor disposição arquitetural dos feixes. Concluiu-se que a associação entre LLLT e filmes de quitosana/alginato de sódio são eficazes em favorecer o reparo de queimaduras de terceiro grau.

Palavras-chave: Filmes, polímeros, cicatrização, laser

Abstract:

Natural polymers presenting different biological activities have been largely used as film dressings to improve wound healing. Laser arrays, on the other hand, present biostimulatory properties apparently able to accelerate the cicatricial repair of soft tissue injuries. Thus, the aim of this paper was to evaluate if the healing of burn wounds dressed with sodium alginate/chitosan-based films can be optimized by lasertherapy. Therefore, third-degree burn procedures were performed in the back of sixty male *Wistar* rats, assigned into 6 groups: untreated (CTR); dressed with commercial hemicellulose-based films (HC), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (QA), and laser-irradiated undressed (LLLT), cellulose-based dressed (HC/LLLT) and sodium alginate/chitosan-based dressed wounds (QA/LLLT). Laser therapy was applied with GaAlAs laser (5J/cm², λ 780 nm, 40 mW, 00.04 mm) for 7 days. Five animals of each group were euthanized 8 and 14 days after burn procedures. On the 8th day, substitution of the acute inflammatory response for granulation tissue was observed in both dressed and irradiated group, but it was more expressive and matured in QA/LLLT than in the others. On the 14th day, substantial reduction of chronic inflammatory infiltrate was observed in all groups, but once again it was more remarkable in NaAl/Ch-irradiated. Combined LLLT and QA dressings also promoted more rapid replacement of Type III for type I collagen fibers, and apparently stimulate the deposition and interlacement of the latter. *Conclusion:* Association of LLLT and sodium alginate/chitosan-based dressing is able to reduce the inflammatory content and favor newly-formed collagen fibers to be better arranged during burn healing.

Keywords: dressings, polymers, burn healing, laser

INTRODUÇÃO

Uma das mais significativas complicações das queimaduras é a infecção secundária resultante da contaminação de feridas expostas, com conseqüente risco de morte (1). Desta forma, o emprego de polímeros naturais apresentando diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas como revestimento dérmico de feridas tem sido largamente estudado em função das numerosas vantagens destes compostos macromoleculares, a exemplo de biocompatibilidade e atoxicidade (2-6). Além disso, bons agentes de revestimento dérmico devem promover redução ou estancamento da perda de fluidos, prevenção da exsudação plasmática, proteção contra contaminação externa e efeito bactericida, além de funcionar adequadamente como leito para alocação de autoenxertos (3).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido por N-desacetilação alcalina da quitina, composto por uma cadeia linear de unidades de glicosaminas associadas por meio de ligações β -1,4 (6). Este biopolímero apresenta uma série de propriedades bastante singulares, como atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que o torna um excelente candidato a aplicações farmacêuticas e biomédicas (7). O desenvolvimento e caracterização de filmes a base de quitosana foram previamente descritos (8). Tais filmes têm sido utilizados como revestimentos dérmicos de feridas, devido sua capacidade de estimular uma ampla gama de eventos biológicos envolvidos no reparo cicatricial (9-13). Em adição, a quitosana também demonstra propriedades hemostáticas e antimicrobianas já comprovadas (14).

O alginato é um polímero de ácido glicurônico e nanorônico formador de gel altamente absorvente com propriedades hemostáticas, biodegradável e bem tolerado por fluidos e componentes celulares do corpo (15). Eles são extensivamente usados como sistemas carreadores para liberação controlada de fármacos e revestimentos dérmicos hemostáticos (16,17). Além disso, estudos demonstram que filmes para revestimento dérmico a base de alginato de sódio foram utilizados com sucesso para melhorar o processo de reparo cicatricial (17, 18, 19).

A despeito de todas estas propriedades apresentadas pelos biomateriais supracitados, existem poucos relatos acerca dos sistemas biológicos baseados na combinação entre quitosana e alginato de sódio sobre a dinâmica do reparo cicatricial (20).

Os raios Laser são uma forma altamente concentrada e não-invasiva de radiação não-ionizante que, em contato com diferentes tecidos, produzem efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares (21). Diversos estudos têm indicado que a terapia laser de baixa potência (LLLT) parece modular diferentes atividades biológicas, como a reação inflamatória, regeneração trófica de células e tecidos (22), e sensação algica (23). Além disso, o papel do laser na estimulação de uma série de eventos envolvidos no processo de reparo, como diferenciação fibroblástica e miofibroblástica (24), proliferação celular (25), angiogênese (26) e síntese de colágeno (27, 28, 29) também vem sendo investigado.

Existem poucos relatos na literatura avaliando o papel desempenhado pela associação entre filmes para revestimento dérmico de feridas expostas e a fototerapia sobre os eventos biológicos que se desenrolam durante a dinâmica do reparo cicatricial. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da associação entre LLLT e filmes poliméricos a base de quitosana/alginato de sódio sobre a intensidade da resposta inflamatória e padrão de deposição de fibras colágenas durante duas fases distintas do reparo de queimaduras dérmicas em modelo roedor.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo dos filmes baseados em alginato de sódio e quitosana. Dispersões oliméricas (1% m/m) foram preparadas por meio da dissolução da quitosana e alginato de sódio separadamente em solução de ácido acético (0,5mol/L) em temperatura ambiente (21°C ± 2°C). O plastificante adicionado à dispersão de quitosana foi o glicerol (20% m/m de massa seca do polímero). A dispersão foi submetida a sonificação para remoção de bolhas de ar, vertida em placas de Petri (10,0 mL) e postas para secagem. Posteriormente, 10 mL da dispersão de alginato de sódio foram vertidos sobre o filme de quitosana e o solvente evaporado. O filme resultante foi removido manualmente das placas e cortado em amostras de 20 x 20 mm

Animais. Foram utilizados 60 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar), pesando 250±50g. Os animais foram armazenados em gaiolas plásticas com cama de maravalha, com água e ração (Labina[®]) *ad libitum*, em ambiente com temperatura (22 °C) e umidade controladas. Antes do início de todos os procedimentos experimentais, este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes (parecer 040508).

Queimaduras e formação dos grupos. Os animais de experimentação foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina (100 mg/kg – 5 mg/kg) e queimaduras de terceiro grau foram realizadas utilizando instrumental com ponta ativa de cobre (1 cm²), aquecido ao rubro, justapondo-os por 20 s à pele do dorso, previamente tricotomizado. Posteriormente, os animais foram divididos randomicamente em seis grupos (n=10), de acordo com o tratamento preconizado para as queimaduras: controle negativo sem tratamento (CTR), filmes de hemicelulose (HC), filmes de quitosana e alginato de sódio (QA), laserterapia (LLLT), e associação entre laser e filmes de hemicelulose (HC/LLLT) e quitosana/alginato de sódio (QA/LLLT).

Protocolo para terapia com a Fotobiomodulação: A fotobiomodulação foi realizada com laser ArGaAl (Twin Laser[®], MMOptics, São Paulo, Brasil), λ 780 nm, potência de 40 mW (área de *spot* equivalente a 0,04 cm) por 120 s, com densidade de energia final de 20J/cm², em quatro pontos diferentes ângulos retos da ferida). Os animais foram irradiados a cada 48 horas, durante 7 dias. A primeira sessão ocorreu imediatamente após a realização das queimaduras e recobrimento das feridas com os filmes experimentais.

Eutanásia. Oito e 14 dias após os procedimentos ambulatoriais de quemadura, a eutanásia de 5 animais de cada grupo administração de cloridrato de zolazepan IM (10 mg/Kg), seguida de tiopental sódico IP (100 mg/Kg) e cloreto de potássio IP (Ariston 19,1%, 2.559 mEq/mL).

Procedimentos histológicos. Após certificação da morte dos animais (cessação de sinais vitais e opacificação da córnea), as feridas foram cirurgicamente removidas, fixadas em formalina tamponada (10%), desidratadas, diafanizadas e emblocadas em parafina. Secções histológicas de 5 μ m foram obtidas e coradas em HE e picrossírius, para posterior análise em microscopia de luz convencional e sob luz polarizada. Foram avaliadas a presença de necrose, tipo e intensidade da reação inflamatória, edema intersticial, reepitelização superficial, vascularização, e padrão de colagenização das feridas

Análise estatística. O índice de reepitelização foi comparado entre os grupos por meio do teste ANOVA com extensão Tukey. A reação inflamatória, edema e vascularização foram analisados por meio do teste Kruskall wallis, com extensão Dunn. Foram consideradas significativas diferenças onde $p \leq 0,05$. O padrão de colagenização foi analisado de maneira descritiva.

RESULTADOS

Do ponto de vista macroscópico, apenas o grupo CTR exibiu sinais clínicos de persistência de fase aguda da inflamação, expresso por formação de clara linha eritematosa (hiperêmica) perilesional e edema observada ao oitavo dia pós-lesão. Não houve indício de supuração em nenhum dos grupos estudados. A adaptação dos “dressings” foi satisfatória nos grupos onde foi utilizado filmes de quitosana e alginato de sódio; todavia quando o filme de hemicelulose foi empregado, a adaptação ficou comprometida após a desidratação da superfície da ferida. Destaca-se que, em 14 dias, todos os filmes haviam sofrido reabsorção.

Como demonstrado na tabela 1, no oitavo dia, a presença de tecido necrótico era marcante nos grupos CTR, HC e QA, mas bem menos expressiva nos grupos irradiados. Apenas CTR exibiu reação inflamatória predominantemente aguda, enquanto que os demais mostraram infiltração eminentemente crônica. O edema intersticial esteve presente em todos os grupos, sendo de moderada intensidade em CTR, HC e HC/LLLT e discreto em QA, LLLT e QA/LLLT. A vascularização variou entre moderada e intensa em praticamente todos os grupos, excetuando QA/LLLT, onde esta foi escassa. Por outro lado, quadros de proliferação ficrocelular expressiva foram observados apenas nos grupos irradiados, particularmente em QA/LLLT (figura 1a). No décimo quarto dia, apenas CTR e HC ainda exibiram infiltração inflamatória crônica, edema intersticial e vascularização moderados, observando-se uma redução substancial destas variáveis nos demais grupos. Contrariamente, a resposta fibroblástica foi menos intensa em CTR e HC que nos demais grupos. Todos os grupos irradiados exibiram redução substancial da resposta inflamatória e da vascularização, em oposição ao nítido aumento da resposta fibrocelular. Destaca-se que, quando presente, a inflamação residual foi eminentemente crônica, composto especialmente por alguns linfócitos e, principalmente, plasmócitos. Nos grupos LLLT e QA/LLLT, não foi observada infiltração leucocitária (inflamatória) residual. Além disso, também não foi verificada presença de focos necróticos em nenhum dos espécimes estudados (figura 1b).

A reepitelização recobriu menos de 10% das superfícies lesadas em todos os casos irradiados e não-irradiados eutanasiados no oitavo dia. Por outro lado, no décimo quarto dia, CTR, HC e QA apresentaram reepitelização superior a 50%, embora as áreas centrais das feridas estivessem ainda descobertas. HC/LLLT apresentou reepitelização avançada, mas em apenas um caso houve epitelização total. A reepitelização foi

completa em três casos de LLLT e todos os casos em QA/LLLT (tabela 2). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CTR e HC e os demais grupos em oito ($p=0,015$), e entre LLLT e QA/LLLT e os demais grupos em 14 dias. ($p=2,26E-05$).

Com relação à deposição colagênica, observou-se que, no oitavo dia, as fibras colágenas se mostraram inconspícuas em CTR. Em HC, foram observadas estruturas fibrilares extremamente delicadas, com comprimento variado e disposição reticular. As fibrilas exibiram birrefringência esverdeada e amarelo-esverdeada sob luz polarizada. Em QA, as fibrilas foram mais abundantes, embora ainda curtas e mantendo a aparência delicada e padrão esverdeado de birrefringência. Estes dois últimos grupos exibiam deposição fibrilar em arranjo paralelo à superfície da ferida e, assim como em CTR, os espaços interfibrilares eram largos e abundantes (figura 2a). Em LLLT e QA/LLLT, os feixes de colágeno se mostraram mais longos, levemente ondulados e com birrefringência variando entre amarelo e laranja, com tendência a disposição francamente paralela. Contudo, observou-se densidade de deposição claramente maior em QA/LLLT. Curiosamente, HC/LLLT mostrou persistência de fibras com tonalidades birrefringentes esverdeadas, embora fascículos alaranjados delicados pudessem ser observados dispersos na profundidade das feridas, assim como espaços interfibrilares abundantes (figura 3b).

No décimo quarto dia, fibras colágenas delgadas, delicadas e irregularmente dispostas foram observadas em CTR, ao passo que se apresentavam nitidamente mais aparentes, mais espessas, e dispostas paralelamente, mas frouxamente arranjadas, em HC. Com relação ao padrão de birrefringência sob luz polarizada, observou-se tanto fibras esverdeadas e amareladas, quanto alaranjadas, com abundância de espaços interfibrilares. Em QA, as fibras colágenas tinham aparência grosseira, e disposição predominantemente paralela, embora alguns fascículos já exibissem arranjo levemente entrelaçado, e birrefringência vermelho-alaranjada (figura 4a). Em todos os grupos irradiados, o colágeno mostrou birrefringência predominantemente alaranjada (e, as vezes, avermelhada), e espaços interfibrilares escassos e esparsamente dispersos. Os grupos LLLT e QA/LLLT mostraram, ambos, feixes de colágeno espessos, grosseiros, densamente dispostos em arranjo entrelaçado, embora em LLLT as fibras mais superficiais ainda se apresentassem paralelas. Por outro lado, em HC/LLLT, o arranjo de fibras colágenas em disposição paralela foi nitidamente predominante, sendo menos espessas que em LLLT e QA/LLLT (figura 4b).

DISCUSSÃO

Recentemente, o aumento gradativo das necessidades clínicas levou ao desenvolvimento de biomateriais, com ênfase na síntese de materiais poliméricos biodegradáveis (30), particularmente aqueles utilizados como revestimento de feridas dérmicas expostas, produzidos sob a forma de filmes chamados de “dressings” (2, 4, 31, 32). No presente estudo, filmes de quitosana/alginate de sódio (QA) apresentaram excelente adaptação a superfície da ferida; além disso, nenhum sinal clínico de persistência de inflamação aguda exacerbada, a exemplo de hiperemia marginal ou supuração, foi verificado quando do emprego destes filmes. Apesar de discreto edema ter sido observado nas feridas revestidas por tais filmes ao final de oito dias, este fenômeno foi interpretado tão somente como representativo dos estágios finais da fase exsudativa da cicatrização de queimaduras. Surpreendentemente os filmes de hemicelulose, comercialmente utilizados em rotina ambulatorial, demonstraram adaptação deficiente à superfície da ferida, embora também tenham se mostrado eficazes em prevenir a persistência da fase aguda da inflamação que antecede os fenômenos proliferativos da reparação cicatricial.

A manutenção do estímulo quimiotático no sítio de flogose é o fator preponderante para o prolongamento da fase aguda exsudativa da inflamação (33), particularmente em feridas expostas abertas, como queimaduras extensas, amplamente susceptíveis a infecção secundária (1). Conquanto apenas as feridas abertas não tratadas (CTR) exibiram sinais clínicos expressivos de inflamação aguda, especialmente hiperemia perilesional persistente, este estudo atesta a significância do uso de filmes para revestimento para melhoria do processo de reparo descrito em relatos prévios (2-6).

Deve ser destacado que a inexistência de alterações clínicas em todos os grupos irradiados (incluindo aquele não revestido por filme) sugere que o laser de baixa potência pode desempenhar um papel importante na regulação dos eventos inflamatórios durante a cicatrização de queimaduras, como proposto em estudos anteriores (22, 27, 29). Além disso, o fato de que nenhum dos grupos estudados mostrou sinal de dano clínico ao décimo quarto dia foi absolutamente esperado, posto que, neste período, os fenômenos proliferativos cicatriciais já tinham se instalado, em substituição aos eventos exsudatos, responsáveis pelos sinais clínicos de inflamação persistente (33).

Histologicamente, apenas as feridas expostas não recobertas por filmes (grupo CTR) exibiram infiltração neutrofilica expressiva ao oitavo dia, enquanto que todos os

outros grupos apresentaram formação de reação de granulação, embora em diferentes estágios de maturação. Estes achados sugerem que todas as alternativas terapêuticas testadas neste estudo foram eficazes em aprimorar a dinâmica do reparo cicatricial. Contudo, as faixas de reação de granulação neoformadas se mostraram claramente mais maduras (menos vasculares e/ou edematosas e mais fibrocelulares) em QA que em HC, indicando que os filmes de quitosana/alginato de sódio conduziram a resultados melhores que os filmes de hemicelulose comercialmente disponíveis no mercado.

Tais resultados podem ser resultado de sinergismo entre as atividades biológicas apresentadas por ambos os materiais usados para formulação dos filmes. Entre os efeitos da quitosana sobre a cicatrização, são citadas propriedades hemostáticas, antimicrobianas (14) e antifúngicas (6). Desta forma, esta macromolécula pode desempenhar uma atividade de “limpeza” de microrganismos na ferida aberta, em adição a atividade protetora mecânica, propiciada por sua formulação em filme tipo “dressing”, reduzindo sensivelmente a possibilidade de contaminação bacteriana externa. Tais propriedades poderiam, pois, favorecer a redução da liberação de mediadores químicos quimiotáticos responsáveis por persistência da fase aguda e conseqüente cronificação retardada do infiltrado inflamatório. Os alginatos, por sua vez, são capazes de modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta imune. Particularmente no início do processo de reparo, como interleucina 6 (IL-6), fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), leucotrieno B4 (LTB4) e prostaglandina E2 (PGE2) (15). Este polímero seria, pois, extremamente útil no controle de respostas tissulares exacerbadas (17, 19), que poderia determinar retardo na instalação da reação de granulação. Além disso, o efeito inibitório sobre a degranulação de mastócito, um fenômeno bioquímico intimamente relacionado ao início da resposta inflamatória aguda, também foi demonstrado previamente (34), o que vem atestar a significância das moléculas alginato de sódio para o aprimoramento da dinâmica inflamatória na primeira fase experimental deste estudo.

Todos os grupos irradiados exibiram processo de reparo avançado quando comparados aos não-irradiados. Os benefícios de diferentes protocolos de laser de baixa potência na cicatrização de feridas cirúrgicas e térmicas estão bem estabelecidos (22, 26, 27, 35). Além disso, a vantagem da associação entre filmes de celulose e LLLT também já haviam sido reportados (36). Neste estudo, todavia, foi a associação entre a fotobiomodulação a laser e filmes de quitosana/alginato de sódio que demonstrou a presença de reação de granulação em fases mais extensivamente maduras (ricamente

fibrocelulares e relativamente avasculares), apontando para um importante papel desempenhado por esta modalidade de tratamento na aceleração das etapas cicatriciais em fases precoces do reparo de queimaduras.

As propriedades biológicas do espectro visível do laser de baixa potência resultam provavelmente da aceleração foto-induzida da transferência de elétrons do NADH e FADH₂ (produzidos no ciclo de Krebs) para moléculas de oxigênio para formar, com o auxílio de prótons de hidrogênio, moléculas de água. A energia liberada pela transferência é aproveitada para o bombeamento de prótons (H⁺) do interior da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, de tal forma que este processo gera uma espécie de bateria biológica em miniatura. Como consequência, ocorre aumento substancial na produção de ATP e, obviamente, na síntese protéica (21, 25). Adicionalmente, têm sido demonstrado que o laser de baixa potência promove efeitos anti-inflamatórios significativos em modelo experimental com animais (37, 38).

A redução substancial da magnitude inflamatória vista em todos os grupos no décimo quarto dia é compatível com o processo evolutivo de reparo cicatricial (33). O fato de que esta redução foi mais expressiva em QA entre os grupos não-irradiados parece atestar a eficiência destes filmes na modulação da resposta inflamatória. Contudo, uma vez mais, os melhores resultados foram obtidos a partir da associação entre filmes de quitosana e alginato de sódio e laser de baixa potência, assegurando a benesse da combinação entre as duas modalidades terapêuticas.

O processo de epitelização foi nitidamente melhor nos grupos irradiados, especialmente em QA/LLLT, que naqueles não-irradiados. Estes achados são alicerçados em relatos prévios demonstrando que o laser de baixa potência estimula a migração de ceratinócitos ao longo da superfície da ferida, a partir da margem intacta da lesão, provavelmente em resposta a ação de citocinas, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator alfa de crescimento transformador (TGF- α), liberadas por macrófagos irradiados (39, 40). Além disso, foi recentemente comprovado em estudos *in vitro* que o laser de baixa potência age diretamente em ceratinócitos, induzindo proliferação (4). Acrescente-se, ainda que tais propriedades bioestimulatórias sobre células epidérmicas, em associação aos efeitos biológicos do alginato de sódio e da quitosana, também podem ter tido um papel extremamente relevante na regeneração precoce de anexos dérmicos (de origem epitelial e clara derivação ceratinocítica) observada no grupo QA/LLLT. No entanto, merece ressalva o fato de que a razão concreta para que a reepitelização em HC/LLLT não tenha sido tão eficiente ainda é

pouco clara. É certo que a persistência de reação inflamatória, ainda que crônica e de baixa intensidade, nos grupos tratados com filme de hemicelulose e laser aos 14 dias, pode ter sido um dos fatores determinantes deste achado, mas a exata natureza deste processo ainda é incerta, e suscita novos estudos para a compreensão adequada deste fenômeno.

Com relação à colagenização, a melhoria da deposição colagênica foi observada em HC e QA, e em especial neste último, embora este achado não tenha sido tão expressivo no oitavo quanto foi no décimo quarto dia. É provável que estes achados possam ter resultado da redução da infiltração neutrofílica verificada nas feridas protegidas com filmes poliméricos, favorecendo o desenvolvimento da reação de granulação, uma fase do reparo amplamente marcada pela liberação de fatores de crescimento que atuam, entre outras células-alvo, em fibroblastos (células produtoras de colágeno). Além disso, foi demonstrada previamente a facilitação da proliferação fibroblástica ativa em resposta a EGF (fator de crescimento epidérmico) quando cultivados sobre membranas de quitosana (42), o que respalda os achados favoráveis observados neste estudo para o grupo QA. Estudos anteriores também sugeriram um possível papel do alginato na dinâmica da colagenização, uma vez que estes polímeros aparentemente são capazes de inibir a ação de hialuronidases, enzimas envolvidas na degradação e remodelação da matriz extracelular (34), o que facilitaria a acomodação do componente colagênico depositado ativamente.

Por outro lado, o laser de baixa potência mostrou-se crítico neste estudo, já que promoveu alterações substanciais no processo de colagenização tanto em oito quanto em 14 dias. Na fase inicial, a irradiação laser pareceu acelerar a substituição de colágeno tipo III (esverdeado ou amarelo-esverdeado) por tipo I (alaranjado ou vermelho alaranjado). O colágeno tipo III está estreitamente relacionado com a orientação espacial da migração das células endoteliais durante os estágios iniciais do reparo, enquanto que o colágeno tipo I é responsável pela força tênsil e estabilidade mecânica do tecido conjuntivo mucocutâneo (43). Nos estágios tardios, os grupos irradiados exibiram deposição mais intensa de feixes grosseiros e espessos de fibras colágenas; em adição LLLT e QA/LLLT apresentaram tendência ao arranjo entrelaçado, lembrando a disposição fibrosa vista na derme íntegra, em oposição ao arranjo paralelo observado em HC/LLLT. Destaca-se que a disposição arquitetural entrelaçada dos

feixes colagênicos é fundamental para a dispersão mecânica de forças dirigidas à pele e mucosas (43).

O papel desempenhado pelo laser de baixa potência na dinâmica da colagenização tem sido bastante estudado, e tem sido relacionado a uma regulação positiva da liberação de citocinas envolvidas na indução de proliferação fibroblástica e síntese de colágeno, tais como fator beta de crescimento fibroblástico (FGF- β) e fator de crescimento transformador (TGF), respectivamente (44, 45). Também tem sido demonstrado que o laser promove uma série de modificações durante o processo de reparo dérmico, destacadamente relacionadas a melhor organização arquitetural e compactação dos feixes colagênicos depositados (29), o que vem respaldar os achados morfológicos observados neste estudo com relação aos grupos irradiados. Adicionalmente, o fato de que a associação entre filmes de quitosana/alginato de sódio e laser de baixa potência promoveu a formação de um padrão de colagenização bastante semelhante àquele visto no tecido dérmico normal alicerça a teoria de que esta combinação terapêutica foi extremamente eficiente em melhorar o reparo cicatricial dérmico.

Todavia, há de se comentar que o grupo HC/LLLT apresentou resultados bem menos expressivos que os outros dois grupos irradiados, mantendo, inclusive, um padrão de organização arquitetural paralelo das fibras colágenas, o que é considerado um arranjo cicatricial imaturo, parecendo sugerir que a associação do laser de baixa potência com filmes de hemicelulose não apresenta a mesma eficácia que com filmes de quitosana/alginato de sódio. Neste contexto, é relevante destacar que embora existam relatos de indução de reações tipo corpo estranho com o uso de filmes de celulose (46), não foi observada, neste estudo, a formação de granulomas após o uso de filmes de hemicelulose, o que sugere que a celulose e seus derivados são, de fato, biocompatíveis, como demonstrado anteriormente (47). Contudo, é preciso ressaltar que estes filmes são, acima de tudo, agentes hemostáticos, de modo que não é esperado que suas moléculas formadoras interajam tão intensamente com os tecidos circunvizinhos, ao contrário das moléculas bioativas presentes nos filmes de quitosana e alginato de sódio. Este fator poderia vir justificar os achados claramente mais interessantes verificados no grupo QA/LLLT que em HC/LLLT. Além disso, não se pode deixar de mencionar que a adaptação pouco satisfatória dos filmes de hemicelulose às lesões por queimadura após

a desidratação superficial do tecido também pode ter influenciado no resultado final, mas estudos posteriores são necessários para melhor esclarecimento deste tópico.

A análise dos resultados apresentados neste estudo permite inferir que a associação entre o laser de baixa potência e filmes bioativos de quitosana e alginato de sódio representa uma medida terapêutica bastante eficaz no tratamento de queimaduras de terceiro grau.

As implicações clínicas dos achados apresentados são de extrema relevância, uma vez que as características físico-químicas e estruturais dos biofilmes de quitosana e alginato de sódio utilizados nesta pesquisa podem permitir seu emprego em uma ampla gama de condições clínicas onde haja desnudamento epitelial ou ulceração com perda de substância, sem possibilidade de coaptação de bordas. No âmbito da Odontologia, parece possível extrapolar os resultados para o tratamento de cirurgias cruentas intra-orais, em que seja necessária a reparação por segunda intenção, como cirurgias por electrocauterização, cirurgias periodontais e frenectomias, quiçá em substituição aos cimentos cirúrgicos convencionais. No entanto, a despeito de todas as vantagens supramencionadas, estudos posteriores são necessários para elucidar todos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dinâmica da estimulação do processo de cicatrização evidenciado neste ensaio biológico preliminar antes de iniciar quaisquer ensaios clínicos.

CONCLUSÕES

- O uso de revestimentos cutâneos sintéticos sob a forma de filmes são eficazes em melhorar a dinâmica do reparo cicatricial.
- Os filmes de quitosana e alginato de sódio foram mais eficientes em aprimorar a dinâmica de reparo que aqueles de hemicelulose comercialmente disponíveis.
- A aplicação do laser de baixa potência modula positivamente a resposta reparativa de queimaduras de terceiro grau.
- A associação entre o uso de filmes e laser de baixa potência trouxe resultados sinérgicos para a aceleração do reparo cicatricial.
- Neste ensaio biológico, os melhores resultados foram obtidos com a associação entre laser de baixa potência e filmes de quitosana e alginato de sódio.

AGRADECIMENTOS:

Os autores gostariam de agradecer imensamente a **Profª. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**, coordenadora do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE) e a **Profª. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro**, da Universidade federal de Sergipe (UFS), pela orientação nas etapas de elaboração dos filmes de revestimento cutâneo sintético e laserterapia, respectivamente; e ao Conselho Nacional de Pesquisa (**CNPq**) pelo apoio financeiro sob a forma de bolsa.

REFERÊNCIAS:

1. Rao CM, George KM, Bairy KL, Somayaji SN. An appraisal of the healing profiles of oral and external (gel) Metronidazole on partial thickness burn wounds Indian J Pharmacol 2000; 32: 282-287
2. Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns. 2001;27:517Y522.
3. Lee JS, Cho YS, Lee JW, Kim HJ, Pyun DG, Park MH, Yoon TR, Lee HJ, Kuroyanagy Y. Preparation of wound dressing using hydrogel polyurethane foam. Trends Biomater Artif Organs. 2001, 15(1): 4-6.
4. Kordestani S, Shahrezaee M, Tahmasebi MN, Hajimahmodi H, Haji Ghasemali D, Abyaneh MS. A randomised controlled trial on the effectiveness of an advanced wound dressing used in Iran. J Wound Care. 2008 Jul;17(7):323-7.
5. Thomas S. A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing. J Wound Care. 2008 Aug;17(8):349-52.
6. Park Y, Kim MH, Park SC, Cheong H, Jang MK, Nah JW, Hahm KS. Investigation of the Antifungal Activity and Mechanism of Action of LMWS-Chitosan. J Microbiol Biotechnol. 2008 Oct;18(10):1729-34
7. Illum, L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm. Res. 15: 1326-133
8. Peh K, Khan T, Ch'ng H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. J Pharm Pharm Sci. 2000 Sep-Dec;3(3):303-11.

9. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*. 2001;22:1667Y1673.
10. Khan TA, Peh KK. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2003 Jan-Apr;6(1):20-6.
11. Alemdaroğlu C, Değim Z, Çelebi N, Zor F, Öztürk S, Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*. 2006;32:319Y327.
12. Rao GDH, Balasubramanian NN, william BJ, Prathaban S. Clinical evaluation of chitin and chitosan in the Management of wounds. *Tamilnadu J Vet Animal Sci*. 2007 May-jun, 3(3) 160-163.
13. Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. *nd Repair Regen*. 2008 May-Jun;16(3):425-31.
14. Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008 Nov;29(32):4323-32. Epub 2008 Aug 15
15. Barnett SE, Varley SJ. The effects of calcium alginate on wound healing. *Ann R Coll Surg EnIG*. 1987 Jul;69(4):153-5.
16. Efentakis M, Buckton G. The effect of erosion and swelling on the dissolution of theophylline from low and high viscosity sodium alginate matrices. *Pharm Dev Technol* 2002; 7(1):69-77.
17. Razavi A, Khodadadi A, Eslami MB, Eshraghi S, Mirshafiey A. Therapeutic effect of sodium alginate in experimental chronic ulcerative colitis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008 Mar;7(1):13-8.
18. Kim JO, Park JK, Kim JH, Jin SG, Yong CS, Li DX, Choi JY, Woo JS, Yoo BK, Lyoo WS, Kim JA, Choi HG. Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *Int J Pharm*. 2008 Jul 9;359(1-2):79-86.
19. Mirshafiey A, Khodadadi A, Rehm BH, Khorramizadeh MR, Eslami MB, Razavi A, Saadat F. Sodium alginate as a novel therapeutic option in experimental colitis. *Scand J Immunol*. 2005 Apr;61(4):316-21.

20. Pei HN, Chen XG, Li Y, Zhou HY. Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate. J Biomed Mater Res A. 2008 May;85(2):566-72
21. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low-level light therapy. Proc of SPIE 2006; 6140: 1-11
22. Ribeiro MS, Silva F, Araújo CE, Oliveira SF, Pelegrini CM, Zorn TM et al. Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: a light microscopy study. J Chin Laser Med Surg 2004; 22: 59-66.
23. Nes AG, Posso MB. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity Lasers. Int Nurs Rev 2005; 52: 68-72.
24. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. Am J Pathol. 1990 Jul;137(1):171-8.
25. Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CC, Chen GS, Yu HS. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. J Invest Dermatol. 2007 Aug;127(8):2048-57.
26. Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. J Photochem Photobiol B. 2006 May 1;83(2):87-93.
27. Yasukawa A, Hrui H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. J Vet Med Sci. 2007 Aug;69(8):799-806
28. Nayak et al 2007
29. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. J Photochem Photobiol B. 2008 Sep 18;92(3):144-52.
30. Wang SB, Liu YG, Weng LJ, MA XJ. Effect of Sodium Alginate Concentration on Membrane Strength and Permeating Property of Poly-L-arginine Group Microcapsule. Chin Chem Letters. 2004. 15(7): 849-852.
31. Bradley M, Cullum N, Nelson EA, Petticrew M, Sheldon T, Torgerson D: Systematic reviews of wound care management: (2) Dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. Health Technol Assessment 1999, 3(17 Pt2):

32. Queen D, Evans JH, Gaylor JDS, Courtney JM, Reid WH: Burn wound dressings - a review. *Burns* 1987, 13:218-228
33. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:283-9.
34. Asada M, Sugie M, Inoue M, Nakagomi K, Hongo S, Murata K, et al. Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61(6):1030-2.
35. Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008 Aug;24(4):199-210
36. Soares LP, Oliveira MG, Pinheiro AL, Fronza BR, Maciel ME Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat. *Photomed Laser Surg*. 2008 Feb;26(1):10-3.
37. Correa F, Lopes Martins RA, Correa JC, Iversen VV, Joenson J, Bjordal JM. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg*. 2007 Aug;25(4):245-9
38. Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DA, Oliveira JR. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med*. 2008 Sep;40(7):500-8.
39. Sakurai Y, Tamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level Laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 29-34.
40. Freitas AC, Pinheiro AL, Miranda P, Thiers FA, Vieira AL. Assessment of inflammatory effect of 830 Laser light using C-reactive protein levels. *Bras Dent J* 2001; 12: 187-190.
41. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity Laser. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 365-72.
42. Karakeçili AG, Satriano C, Gümüşderelioğlu M, Marletta G. Enhancement of fibroblastic proliferation on chitosan surfaces by immobilized epidermal growth factor. *Acta Biomater*. 2008 Jul;4(4):989-96.

43. Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. Ann N Y Acad Sci. 1990;580:161-75.
44. PuIGiese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZA. The influence of low-level Laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras 2003; 4: 307-313.
45. Poon VK, Huang L, Burd A. Biostimulation of dermal fibroblasts by sublethal Q-switched Nd:YAG 532nm Laser: collagen remodeling and pigmentation. J Photoche Photobiol 2005; 81: 1-8.
46. Gao, H.W., Lin, C.K., Yu, C.P., Yu, M.S., and Chen, A. (2002). Oxidized cellulose (Surgicel) granuloma mimicking a primary ovarian tumor. Int J Gynecol Pathol. 21, 422–423
47. Fricain, J.C., Granja, P.L., Barbosa, M.A., de Jéso, B., Barthe, N., and Baquey, C. (2002). Cellulose phosphates as biomaterials. *In vivo* biocompatibility studies. Biomaterials. 23, 971–980.

Tabela 1. Análise morfológica da resposta inflamatória nos grupos experimentais estudados 8 e 14 dias após a indução das lesões por queimaduras.

8 Dias						
Achados morfológicos	Grupos Experimentais					
	CTR	HC	QA	LLLT	HC/LLLT	QA/LLLT
Presença de necrose	3	2	2	1	1	0
Inflamação aguda	2	1	1	0	0	0
Inflamação crônica	0	3	3	2	3	2
Edema intersticial	2	2	1	1	2	1
Vascularização	2	3	3	2	3	1
Resposta fibrocelular	0	1	1	2	2	3
14 Dias						
Achados morfológicos	Grupos Experimentais					
	CTR	HC	QA	LLLT	HC/LLLT	QA/LLLT
Presença de necrose	0	0	0	0	0	0
Inflamação aguda	0	0	0	0	0	0
Inflamação crônica	2	2	1	0	1	0
Edema intersticial	2	2	0	0	0	0
Vascularização	2	2	1	1	1	1
Resposta fibrocelular	2	2	3	3	3	3

(0) ausente; (1) leve; (2) moderado; (3) intenso

Tabela 2. Análise morfológica da reepitelização percentual nos grupos experimentais estudados 8 e 14 dias após a indução das lesões por queimaduras.

	CTR	HC	QA	LLLT	HC/LLLT	QA/LLLT
7 dias	0	1	1	1	1	1
	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1
14 dias	2	3	3	3	4	4
	3	3	3	4	3	4
	2	3	3	3	3	4
	3	3	3	4	3	4
	3	3	3	4	3	4

Legenda: (0) ausente; (1) menos de 10% de reepitelização superficial; (2) reepitelização superficial recobrindo entre 10 e 50% da superfície da ferida (3) reepitelização superficial recobrindo mais de 50% da superfície da ferida, mas ainda incompleta; (4) Reepitelização completa.

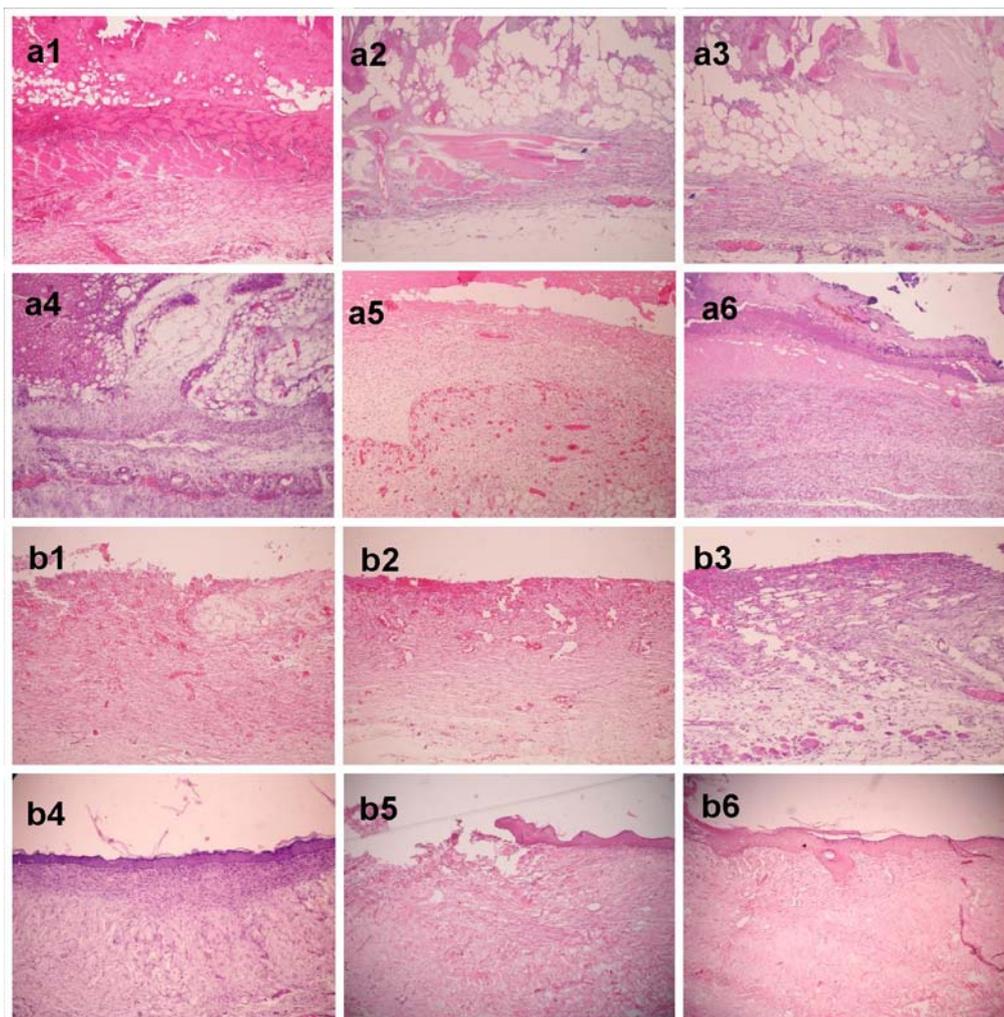


Figura 1. Características histológicas das lesões em 8 (a) e 14 dias (b). Grupo CTR (a1/b1), HC (a2/b2), QA (a3/b3), LLLT (a4/b4), HC/LLLT (a5/b5) e QA/LLLT (a6/b6). Observar reação de granulação mais madura em LLLT e QA/LLLT no oitavo dia, e cicatriz fibrosa bem formada nos mesmos grupos no décimo quarto dia. Destaque, ainda, para anexos dérmicos vistos em QA/LLLT (HE, 100x).

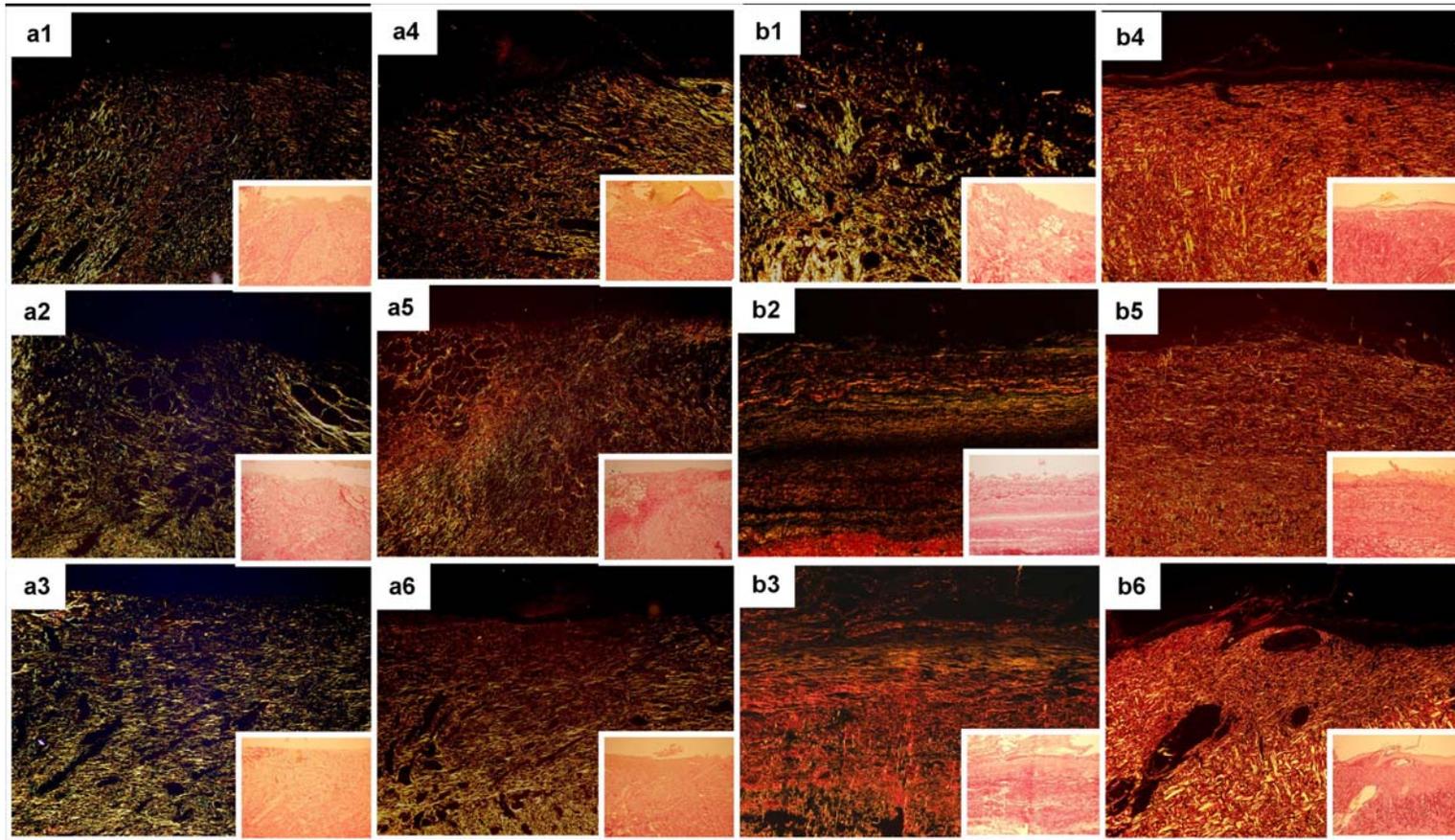


Figura 2. Apresentação morfológica do padrão de deposição colagênica em 8 (a) e 14 dias (b). Grupo CTR (a1/b1), HC (a2/b2), QA (a3/b3), LLLT (a4/b4), HC/LLLT (a5/b5) e QA/LLLT (a6/b6). Observar reação maior densidade de deposição de fibras de colágeno tipo III, associadas a fibrilas de colágeno tipo I, em LLLT e QA/LLLT no oitavo dia, e feixes espessos, grosseiros e entrelaçados de colágeno I, lembrando a derme normal, no décimo quarto dia (Picrosítius/polarização, 100x). Em menor detalhe estão as imagens observadas em microscopia convencional.