

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E FILMES
DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO SOBRE
A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS

Marx Diego Meneses Dantas

ARACAJU
AGOSTO – 2012

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E FILMES
DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO SOBRE
A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS

Dissertação submetida à banca
examinadora para a obtenção do
título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

Marx Diego Meneses Dantas

Orientador: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.

ARACAJU
AGOSTO – 2012

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE Mestrado SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA

D192e Dantas, Marx Diego Meneses.
Efeitos da associação entre laserterapia de baixa potência e filmes de quitosana e alginato de sódio sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas. / Marx Diego Meneses Dantas ; orientador : Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior. – Aracaju, 2012.

35 p. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação apresentada à Universidade Tiradentes como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

1. Coberturas . 2. Polímeros. 3. Cicatrização de feridas .4. Laser . I.

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E FILMES
DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO SOBRE
A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS

Marx Diego Meneses Dantas

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E
AMBIENTE

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
1º Examinador

José Melquiades de Rezende Neto, D.Sc.
2º Examinador

ARACAJU
AGOSTO - 2012

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

Ao meu pai **José Dantas**, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, pai dedicado, amigo, batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho;

A minha mãe **Maria José Meneses Dantas**, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho;

Aos meus irmãos **Igor Alexandre** e **Tamara** pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, sempre foram pai e mãe para mim em todas as horas, por terem sido tão dedicado em minha criação, sempre me apoiando em todos os momentos, enfim por todos os conselhos e pela confiança em mim depositada meu imenso agradecimento, não esquecendo minha “filha” sobrinha **Eduarda Maria** que o “dindo” tanto ama;

Aos amigos que fiz durante a pós Marcos “Marquinhos”, Ítalo, Jamile, Tereza, Igor, Shiella, Waleska, Mauro, Roneval “Rony”, Caparram pela verdadeira amizade que construímos e em especial aos meus amores, irmãs, amigas, **Salvyana Carla Palmeira Sarmiento Silva “Sal”** e **Gleide Maria Gatto Bragança “Gatto”**, anjos de luz, pessoas iluminadas, sempre dispostas a ajudar, dar uma palavra amiga, por tantas noites que passamos acordados estudando, sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa;

Ao meu orientador, pai, padrinho, amigo **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser um exemplo de profissional e de homem o qual sempre fará parte da minha vida.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, em especial, **Francine Ferreira Padilha**, **Juliana Cordeiro Cardoso**, **Cristiane Costa da Cunha Oliveira**, **Marlizete Maldonado Vargas**, **Margarete Zanardo Gomes**, pelo convívio e aprendizado, exemplos de pesquisadores;

Aos amigos do que fiz no ITP nos laboratórios de Biomateriais e Morfologia e Biologia Estrutural, **Daniel**, **Judson**, **Klebson**, **Sueli**, **Maysa**, **Mayra**, **Nely**, **Prof. José Melquiades “Kid”**, **Prof.^a Barbára Leite**, meu muito obrigado;

Ao amigo **Prof. Enrik Barbosa de Almeida**, orientador do meu estagio de docência, pela confiança em mim depositada meu imenso agradecimento;

A todos meus amigos.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CTR- Grupo controle

CL- Grupo coberto com filme de celulose

SC- Grupo coberto com quitosana e alginato de sódio

LT- Grupo sem uso de filmes e uso de laserterapia de baixa potência

CLLT- Grupo coberto com filme de celulose e uso de laserterapia de baixa potência

SCLT- Grupo coberto com filme de quitosana e alginato de sódio e uso de laserterapia de baixa potência

ADP- Adenosina difosfato

ATP- Adenosina trifosfato

pH- Potencial hidrogeniônico

FGFS- Fatores de crescimentos dos fibroblastos

nm- Nanómetro

PGE₂- Prostaglandina 2

COX-2- Ciclo-oxigenase-2

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E FILMES DE QUITOSANA E ALGINATO DE SÓDIO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS

Marx Diego Meneses Dantas

Resumo

Existem atualmente diversos polímeros naturais com diferentes atividades biológicas utilizadas como filmes de revestimentos para a melhora da cicatrização. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre a laserterapia de baixa potência com filmes de quitosana com alginato de sódio sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas. A laserterapia de baixa potência acelera a reparação da cicatrização de lesões de tecidos moles. O procedimento da queimadura foi realizado no dorso de 60 ratos machos que foram divididos em seis grupos: não tratado (CTR), coberto com filmes de celulose (CL), coberto com filme de quitosana e alginato de sódio (SC), feridas não cobertas com uso da laserterapia de baixa potência (LT), feridas cobertas com filme de celulose com uso da laserterapia de baixa potência (CLLT) e filmes de quitosana com alginato de sódio com o uso de laserterapia de baixa potência (SCLT). A laserterapia de baixa potência foi aplicada durante 7 dias. Os animais de cada grupo foram sacrificados entre 8 e 14 dias após os procedimentos de queimaduras. A reação inflamatória foi significativamente mais intensa no grupo CTR do que nos grupos irradiados após 8 e 14 dias. A laserterapia de baixa potência estimulou a diferenciação miofibroblástica em 8 dias, com ou sem filmes. A combinação da laserterapia de baixa potência e utilização de filmes mostrou que houve melhora na epitelização, formação de novos vasos sanguíneos e colagenização, promovendo uma rápida substituição do colágeno tipo III, para o colágeno tipo I e favoreceu a melhora do arranjo de fibras de colágeno recém-formada. A combinação de laserterapia de baixa potência e filmes de quitosana com alginato de sódio melhorou a

cicatrização da queimadura, aparentemente, modulando a epitelização promovendo a formação de vasos sanguíneos e melhora no processo de colagenização.

Palavra chave: Coberturas, Polímeros, Cicatrização de feridas, Laser.

IMPROVEMENT OF DERMAL BURN HEALING BY COMBINING SODIUM ALGINATE/CHITOSAN-BASED FILMS AND LOW LEVEL LASER THERAPY

Marx Diego Meneses Dantas

Abstract

There are currently several natural polymers with different biological activities such as film coatings used for improved healing. This study aimed to evaluate the effect of the association between low level laser therapy with films of chitosan with sodium alginate on the healing of dermal burns. The low level laser therapy accelerates the healing repair of soft tissue injuries. The procedure was carried out of the burn on the back of 60 male rats were divided into six groups: untreated (CTR), covered with films of cellulose (CL), covered with a film of sodium alginate and chitosan (CS), wounds not covered with use of low-power laser therapy (LT), wounds covered with a film of cellulose with the use of low level laser therapy (CLLT) and films of chitosan with sodium alginate using low level laser therapy (SCLT). The low level laser therapy was applied for 7 days. The animals of each group were sacrificed between 8 and 14 days after burns procedures. The inflammatory reaction was significantly more intense in the CTR group than in the treated group after 8 and 14 days. The low level laser therapy stimulated myofibroblastic differentiation in 8 days with or without film. The combination of low level laser therapy and use of films showed an improvement in epithelialization, formation of new blood vessels and collagen, promoting rapid replacement of collagen type III to type I collagen and improves the favored arrangement of collagen fibers newly formed. The combination of low level laser therapy and films of chitosan with sodium alginate improved the healing of the burn apparently modulating epithelialization promoting blood vessel formation and improves the process of collagen.

Key words: Dressings, Polymers, Burn healing, Laser.

SUMÁRIO

	Pág
LISTAS DE SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	11
CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1. PELE	14
2. QUEIMADURAS	14
3. CICATRIZAÇÃO	15
4. COBERTURAS DÉRMICAS “DRESSINGS”	19
5. ALGINATO	20
6. QUITOSANA	22
7. LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA	23
8. REFERÊNCIAS	26
CAPITULO 2- OBJETIVOS	33
 OBJETIVO GERAL	33
 OBJETIVO ESPECÍFICO	33
CAPITULO 3- ARTIGO - Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy	35

INTRODUÇÃO

Uma das mais significativas complicações das queimaduras é a infecção secundária resultante da contaminação de feridas expostas, com consequente risco de morte (Raoo et al., 2000). 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 (Shakespeare, 2001; Lee et al., 2001; Kordestani et al., 2008; Thomas, 2008; Park et al., 2008). 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 (Lee et al., 2001).

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 (Park et al., 2008). 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 (Illum, 1998). O desenvolvimento e caracterização de filmes a base de quitosana foram previamente descritos (Peh et al., 2000). 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 (Ueno et al., 2001; Khan e Peh, 2003; Alemdaroğlu et al., 2006; Rao, 2007; Burkatovskaya et al., 2008). Em adição, a quitosana também demonstra propriedades hemostáticas e antimicrobianas já comprovadas (Ong, 2008).

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 (Barnett e Varley, 1987). Eles são extensivamente usados como sistemas carreadores para liberação controlada de fármacos e revestimentos dérmicos hemostáticos

(Efentakis e Buckton, 2002, Razavi et al., 2008). 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 (Razavi et al., 2008, Mirshafiey et al., 2005).

Em relação às propriedades apresentadas pelos biomateriais, existem muitos relatos acerca dos sistemas biológicos baseados na combinação entre quitosana e alginato de sódio sobre a dinâmica do reparo cicatricial (Pei et al., 2008).

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 (Hamblin e Demidova, 2006). Diversos estudos têm indicado que a laserterapia de baixa potência parece modular diferentes atividades biológicas, como a reação inflamatória, regeneração trófica de células e tecidos (Ribeiro et al., 2004), e sensação algica (Nes e Posso, 2005). Além disso, o papel do laser na estimulação de uma série de eventos envolvidos no processo de reparo, como diferenciação fibroblástica e miofibroblástica (Poureau-Schneider et al., 1990), proliferação celular (Hu et al., 2007), angiogênese (Bayat et al., 2006) e síntese de colágeno (Yasukawa et al., 2007, Medrado et al., 2008) também vem sendo investigado.

Existem poucos relatos na literatura avaliando o papel desempenhado pela associação entre filmes para revestimento dérmico de feridas expostas com a laserterapia 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 a laserterapia de baixa potência e filmes poliméricos a base de quitosana e 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.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PELE

A pele é um dos maiores órgãos atingindo 16% do peso corporal do corpo, sendo construída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. A epiderme é mais externa, composta por um epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado; já a derme é a camada mais profunda, sendo formada por estroma fibroelástico denso de tecido conjuntivo que possui extensas redes vasculares e nervosas (Widelitz et al., 1997; Wells et al., 2010).

A epiderme consiste em um epitélio estratificado organizado com apêndices como: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas que se projetam da derme. A epiderme tem como função proteção contra traumas físicos e químicos, força de tensão, prevenção de desidratação e perda de eletrólitos (Junqueira e Carneiro, 2008).

A derme é uma camada mais espessa de tecido conjuntivo que se estende da epiderme ao tecido subcutâneo. É nela que se situam os anexos da pele, os vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos. Tem como função promover a flexibilidade à pele, determinar proteção contra traumas mecânicos, manter a homeostase, determinante da cor da pele (Ikawa et al., 2002)

2. QUEIMADURAS

As queimaduras sempre foram um grande desafio para a humanidade pela gravidade das lesões e multiplicidades de complicações que são adquiridas, como a capacidade de causar sequelas funcionais, estéticas e psicológicas (Júnior e Serra, 2004).

As queimaduras são feridas traumáticas causadas, na maioria das vezes, por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radiativos. Atuam nos tecidos de revestimento do corpo, determinando destruição parcial ou total da pele e seus

anexos, podendo atingir camadas mais profundas como o tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos (Leão et al., 2011).

As queimaduras possuem vários graus que serão determinados pela sua profundidade da lesão na pele. As lesões de 1º grau, atingem a camada mais externa da pele, a epiderme, as lesões de 2º grau, atingem tanto a epiderme quanto a derme, podem ser superficiais, atingindo toda a epiderme e parte da derme ou profundas atingindo quase toda a derme, as lesões 3º grau, atingem toda a camada da pele e em muitos casos atingindo também o tecido subcutâneo, músculo e o tecido ósseo (Othman, Kendrick, 2010).

No Brasil, as queimaduras contribuem com 57% do total de mortalidade na faixa etária de 0 a 19 anos e corresponde a 38% dos principais agravos atendidos no sistema de saúde. Sabe-se que cerca de 1.000.000 de casos de queimaduras ocorrem ao ano, dos quais 100.000 pacientes procurarão atendimento hospitalar e 2.500 irão a óbito em decorrência de suas lesões. Estima-se uma taxa de mortalidade entre 0,86% a 34,4%, sendo que a maior parte ocorre por infecção e o período de internação é, em média, de 1 a 266 dias. Adicionalmente o tempo necessário para a cura da queimadura é um dos principais determinantes para o desenvolvimento de complicações (Andrade et al., 2010).

3. CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é uma cascata complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, esses eventos devem seguir uma sequência apropriada e serem controlados com precisão pra não haver um descontrole como no caso de uma cicatrização hipertrófica ou quelóide. A cicatrização se divide em três fases: inflamação, fase fibroblástica e maturação e remodelamento. Cada uma dessas fases apresenta várias interações entre diferentes tipos celulares teciduais e/ou sanguíneos, fatores de crescimento, citocinas e matriz extracelular, não

havendo de fato uma separação entre elas, mas sim uma superposição (Rodero e Khosrotehrani, 2010).

A fase inflamatória é a resposta do corpo à lesão tecidual seja ele térmico, químico, traumático, biológico, na maioria dos casos, ocorre uma solução de continuidade de integridade vascular da área lesionada. A ruptura de vasos sanguíneos leva ao extravasamento de sangue para o tecido subjacente, levando os vasos a contrair-se, ocorrem aderência e agressão de plaquetas no local e em seguida ocorre a ativação da cascata de coagulação, resultando na formação de um trombo que primeiramente é rico em plaquetas e é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso em seguida os eritrócitos são capturados por essa rede de fibrina e forma-se então um trombo vermelho que além de limitar a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz preliminar, que dará suporte a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (Goldenberg e Dielgemann, 2012).

As plaquetas extravasadas aderem ao colágeno no espaço perivascular, utilizando receptores na membrana celular plaquetária específicos para proteínas da matriz extracelular. O contato com o colágeno fibrilar ativa as plaquetas induzindo a formação de proteínas adesivas específicas como, glicoproteína plaquetária IIb/IIIa, que liberam o conteúdo de seus grânulos alfa que contém fibrinogênio, fibronectina, fator de Willebrand e trombospodina, essa interação estabiliza e fortalece a nova matriz provisória. Com essas plaquetas ativadas aumenta a ação da protrombinase, que promove maior produção de trombina, a partir da protrombina, criando assim condições para a amplificação da adesão plaquetária. O ADP liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas é outro elemento amplificador da agregação plaquetária. A reunião de todos esses estímulos é necessário para a indução de uma reação inflamatória aguda (Mandelbaunn et al., 2003).

A matriz extracelular recém-formada proporciona um substrato para subsequente migração de leucócitos. Os primeiros a chegarem ao local são os neutrófilos que tem como função fagocitar e depois os macrófagos derivados dos monócitos começam a acumular-se no local ferido entre o segundo e

quinto dia após a lesão. O influxo de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região aumenta a demanda por oxigênio com consequente elevação das concentrações de ácido láctico e queda de pH. Esta combinação de hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico, ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento. Os macrófagos têm como função ajudar os neutrófilos na fagocitose de microrganismos e debris teciduais, bem como liberar fatores de crescimento de citocinas, que são importantes na manutenção da reação inflamatória e na iniciação, maturação e controle do processo de cura da ferida (Dielgemann e Evans, 2004).

A fase fibroblástica tem a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles a migração e ativação de fibroblastos é intensificada o que leva a matriz extracelular a ser substituído por um tecido conjuntivo mais forte e elástico o colágeno. Fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da ferida e induzidos a sintetizar essa proteína, num processo coletivo chamado fibroplasia. Ocorre neovascularização de modo que os novos capilares brotam dos tecidos viáveis na borda da ferida, migrando até o espaço da ferida (Rodero e Khosrotehrani, 2010). A contração da ferida começa a fazer com que suas margens se aproximem mais, e se o tecido original estava revestido por uma superfície epitelial, a reepitelização começa a cobrir a ferida em um processo de cura (Porter, 2007).

A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento, esse tecido consiste de uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos e vasos recém-formados e exsudativos. Os sinais responsáveis pela formação de tecido de granulação são variados, primeiramente os fatores de crescimento desempenham um papel crucial na migração e diferenciação celulares necessárias para a formação de tecido de granulação, em seguida a matriz extracelular, formada por constituintes plasmáticos, plaquetas, macrófagos e os fibroblastos que vão chegando, proporciona um meio para aderência, migração e orientação de células que irão formar o tecido em desenvolvimento (Balbino, et al., 2005).

A neovascularização ocorre simultaneamente com o crescimento dos fibroblastos a partir das margens da ferida, as células endoteliais no interior dos capilares intactos nas margens da ferida irrompem através da membrana basal da parede vascular mediante a secreção da colagenase e do ativador do plasminogênio. Essas células migram na direção do espaço ocupado pela ferida, utilizando como substrato matriz extracelular ali presente. A proliferação das células endoteliais apenas ocorre no vaso genitor para a devida substituição das células que migraram, o broto capilar une-se ao capilar genitor, para que estabeleça o fluxo sanguíneo. Os macrófagos situados no espaço ocupado pela ferida são responsáveis pela elaboração de substâncias angiogênicas como os fatores de crescimento do fibroblasto FGFs. Com a migração de macrófagos até a ferida e subsequente formação de tecido de granulação os componentes da matriz extracelular são manufaturados pelas células *in situ*, dando origem a fibronectina, que atua na fixação celular, originada da grande quantidade de fibroblastos (Kiwanuka et al., 2012).

A maturação e remodelagem e a fase final de cura da ferida, durante essa fase a cicatriz adquire sua máxima resistência, para que haja uma máxima força tênsil, há necessidade de muitos meses, e mesmo anos de remodelagem ainda assim uma cicatriz cutânea completamente madura tem em torno de 70% da resistência da pele normal (Tazima et al., 2008).

A resistência de uma cicatriz se deve ao acúmulo de da deposição de colágeno e a remodelagem das fibrilas de colágeno de modo que sejam formados feixes maiores dessa proteína, com maior número de ligações covalentes transversais de fibrilas (Mulder et al., 2012).

O processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibrilas e fibras de colágeno, dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido, essas fibras de colágeno são digeridas pela enzima colagenase e depositadas novamente em arranjos similares aos ocorrentes no tecido afetado adjacente. A colagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida, leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (Dielgemann e Evans, 2004).

4. COBERTURAS DÉRMICAS OU “DRESSINGS”

Quando a perda tecidual resultante da formação da ferida é extensa, o processo de cicatrização pode não ser suficiente para garantir o desenvolvimento adequado de reparação. Nestes casos, além da limpeza e desbridamento, outro princípio importante da terapia tópica de feridas é a oclusão com substitutos dérmicos sintéticos (coberturas dérmicas) sob a forma de filmes ou membranas (Weller e Sussman, 2006).

A escolha da cobertura mais apropriada para manter o ambiente propício para a reparação tissular deve observar os seguintes princípios: manter umidade na interface ferida/cobertura, remover o excesso de exsudato, permitir a troca gasosa, promover isolamento térmico, proporcionar proteção contra infecção, ser isento de partículas e contaminantes e permitir a remoção sem causar traumas. Além destas, acrescenta-se ainda disponibilidade, flexibilidade, facilidade de manuseio e custo-eficácia (Eaglstein, 2001; Boateng et al., 2008).

São vários os efeitos benéficos do uso de substitutos dérmicos sob a forma de filmes: prevenção de desidratação do tecido e morte celular, angiogênese acelerada, desbridamento autolítico, pois eles retêm as enzimas e água que ajudam na fibrinólise, e redução da dor, atribuídos a proteção que o meio úmido fornece as terminações nervosas do ressecamento e exposição. O uso desses filmes ainda mantém as células viáveis e permitem que elas liberem fatores de crescimento estimulando sua proliferação (Bajay e Araujo, 2003).

Os filmes para cobertura de feridas podem ser produzidos com diferentes materiais, e, portanto, apresentar características oclusivas diferentes. Dentre os materiais utilizados, destacam-se os hidrocolóides, alginatos e hidrogéis (Hoyama et al., 2005), dentre outros, mas nenhum deles atende plenamente aos requisitos que caracterizam o substituto dérmico ideal (Seamann, 2002).

O filme de quitosana estimula a proliferação de células e suas propriedades biológicas são bastante úteis no tratamento de feridas. Membranas finas e flexíveis à base de quitosana e alginato têm se mostrado eficientes quando comparadas à gaze no tratamento de feridas, pois aceleram o processo de cura. A quitosana estimula a proliferação de células e a organização dos tecidos, provê estrutura e crescimento celular e fornece proteínas para cicatrização, fortalece o novo tecido, atua como barreira contra agentes infecciosos, minimiza a deformação cutânea, além de estimular a coagulação sanguínea natural, absorve fluidos provenientes da ferida e bloqueia as terminações nervosas, amenizando os efeitos da dor (Nicolisi e Moraes, 2005).

5. ALGINATO DE SÓDIO

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear obtido a partir de algas marrom ou bactérias e é composto por resíduos dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico na forma de sal de sódio, unidos por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia. Características como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxidez tornam o alginato de sódio um material interessante para inúmeras aplicações (Pei, 2008).

O alginato é amplamente utilizado em alimentos, cosméticos e medicamentos e também encontra aplicação na indústria têxtil e de papel. Atualmente vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica. Em função de suas características é utilizado como espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de encapsulação, agente de gelificação, agente de formação de filmes e de fibras sintéticas entre outras possibilidades (Muller et al., 2011).

O alginato utilizado atualmente é extraído de algas, entretanto a sua produção por microrganismos irá permitir uma exploração controlada de suas fontes naturais. Adicionalmente, a produção por microrganismos pode ser

realizada sob condições controladas, usando substratos de qualidade constante e permitindo assim a obtenção de materiais específicos com características uniformes (Muller et al., 2011).

Curativos a base de alginato têm se mostrado efetivos no tratamento de áreas queimadas e de áreas doadoras de enxertos, o gel de alginato ajuda na remoção do curativo sem muito trauma e diminui a dor durante as trocas de curativos além de promover um ambiente propício à reepitelização do tecido danificado (Nicolisi e Moraes, 2005; Kim et al., 2008).

Thu et al (2012) desenvolveram hidrogéis em bicamada de alginato para utilização em cicatrização. Segundo os autores, a bicamada de alginato proporciona menor permeabilidade ao vapor d'água e seria mais útil para tratamento de feridas supurativas. Além disso, os filmes em bicamada permitem hidratação lenta e contínua e liberação mais controlada de fármacos, sendo, portanto, mais adequados para aplicação em superfícies de feridas.

O mecanismo de ação que determina a atividade pró-cicatrizante do alginato ainda vem sendo discutida na literatura. Thomas et al (2000) demonstraram que curativos (*dressings*) contendo alginato de sódio são potencialmente capazes de ativar macrófagos presentes na área lesada, por meio do estímulo a liberação de TNF- α , gerando um sinal pró-inflamatório capaz de promover incremento da fagocitose de microrganismos e restos necróticos (*wound cleaning*) e, portanto, favorecendo a resolução do processo cicatricial.

Adicionalmente, o alginato de sódio apresenta outras propriedades de interesse para uso como curativos ou coberturas de feridas dermo-mucosas, como atividade hemostática, controlando o sangramento pós-traumático e facilitando a formação do coágulo característicos das fases iniciais do reparo (Hama et al., 2010).

Lee e Mooney (2012) realizaram uma extensa revisão sobre as propriedades biológicas e potencial aplicabilidade do alginato e seus derivados na área biomédica. Segundo os autores, coberturas de alginato funcionam perfeitamente como matrizes para incorporação de fatores de crescimento,

atuando como sistema de liberação controlada de substâncias que propiciam incremento substancial do processo de reparo.

6. QUITOSANA

A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos etc., composto pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada, como comprovada por difração de raios-X. Dessa forma, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização (Badawy e Rabea, 2011).

A quitosana é um biopolímero cujo grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação. A massa molar média da quitina nativa é geralmente maior do que 10^6 Daltons, enquanto a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de $1,0 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$ Daltons (No et al., 2000).

Este biopolímero pode facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epicloridrina, são usados para aumentar a sua estabilidade química e a resistência mecânica (Laranjeira, 2009; Wang et al., 2012).

A alta hidrofiliabilidade da quitosana, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas

aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens etc. (Chen et al., 2009).

O biopolímero quitosana pode ser modificado fisicamente, sendo uma das vantagens mais interessantes a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas, esponjas, colméias, fibras e fibras ocas (Bernkop-Schnürch e Dünnhaupt, 2012).

Jayakumar et al (2011) realizaram uma revisão sobre a utilização de coberturas de ferida dérmica à base de quitina e quitosana, veiculadas sob a forma de materiais fibrosos, hidrogéis, biomembranas e esponjas. Entre as vantagens deste material biológico estão a durabilidade, atoxicidade, capacidade de absorção de líquidos, atividade antibacteriana e boa biocompatibilidade. Adicionalmente, os autores comentam que membranas de quitosana são utilizadas com sucesso como *dressing* de feridas dérmicas em razão de seu efeito antimicrobiano e capacidade de induzir proliferação migração de células estromais.

7. LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA

As propriedades terapêuticas do laser vêm sendo estudadas desde a proposição da teoria de emissão estimulada por Einstein, 1917, sendo sugerida pela primeira vez em 1957, por dois cientistas americanos, Charles Townes e Arthur Achawlow, tornado-se realidade em 1960, com a construção do primeiro emissor de laser a rubi por Theodore Mainman (Medrado, 2003).

A palavra laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, luz amplificada por emissão estimulada de radiação. As características que diferem a luz laser de uma lâmpada comum são: a monocromaticidade, a coerência e a direcionalidade. A possibilidade de focalização em pequenas áreas e a emissão de altas densidades de energia fazem do laser um instrumento de grande interesse e importância para

aplicações nas áreas da saúde, tanto no diagnóstico como na terapia. (Bayat et al., 2006).

O laser pode apresentar diferentes meios ativos, os quais podem ser sólido, líquido ou gasoso. O laser Diodo é um chip semicondutor que funciona como um diodo elétrico, onde a região ativa lembra um “sanduíche” de materiais semicondutores diferentes. Na maioria dos semicondutores a energia é liberada em forma de calor, porém, em materiais como o Gálio, o Alumínio e o Arsênio, a energia é liberada em forma de fótons. Estes possuem comprimentos de onda no espectro vermelho e infravermelho (620 a 1500nm), os quais são determinados pelo tipo de material semicondutor utilizado. (Correa et al., 2007).

Os Lasers são divididos em lasers de alta e baixa potência. Os primeiros são destinados à remoção e coagulação de tecidos, enquanto que os lasers de baixa potência são utilizados em processos de reparação tecidual. Os principais efeitos gerados pelo laser de baixa potência nos tecidos tem natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização, etc. (Dadpay et al., 2012).

A laserterapia de baixa potência tem ação principalmente nas organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, lisossomas e membrana, gerando aumento de ATP e modificando o transporte iônico. Acredita-se que existem fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas provocando a liberação de substâncias pré-formadoras, como a histamina, bradicinina e serotonina acelerando ou retardando estas reações enzimáticas normais. Desta forma a laserterapia de baixa potência acelera, em curto prazo, a síntese de ATP (Glicólise e Oxidação Fosforilativa) e em longo prazo a transcrição e replicação do DNA. (Piva et al., 2011).

Os lasers de baixa potência são utilizados para acelerar os processos reparativos do tecido duro e do tecido mole, devido aos efeitos biomoduladores nas células e tecidos. Eles ativam ou inibem processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos através de efeitos fotofísicos ou fotoquímicos. Esses fenômenos biomodulatórios promovem os efeitos terapêuticos de

morfodiferenciação e proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução do edema, maior regeneração celular, aumento da microcirculação local e permeabilidade vascular. (Correa, 2007; Medrado, 2003; Melo et al., 2011).

A laserterapia de baixa potência tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos observados na terapia com anti-inflamatórios não-esteroidais, inibindo e/ou diminuindo a concentração de prostaglandina E₂ (PGE₂), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e histamina (Piva et al., 2011).

Dessa forma a laserterapia pode ser capaz de modular a inflamação em vários tecidos e apresenta vantagens como método não invasivo, não farmacológico, e como baixo índice de efeitos colaterais (Piva et al., 2011).

Ribeiro et al (2009a) realizaram um estudo em ratos utilizando laserterapia de baixa potencia em feridas abertas de ratos. Os autores observaram uma redução substancial do infiltrado inflamatório e incremento importante da fibrogênese nos animais irradiados, sugerindo que a fotobiomodulação à laser pode representar uma alternativa útil no tratamento de feridas em curso cicatricial por segunda intenção.

Ribeiro et al (2009b) também demonstraram em modelos experimentais que protocolos de irradiação á laser de baixa potência são capazes de promover a inibição da proliferação de linfócitos T e B no sítio da injúria tissular, reduzindo o tempo de inflamação crônica e favorecendo ao reparo. Além disso, a laserterapia de baixa potência pareceu estimular a diferenciação miofibroblástica, melhorando o processo de contração da ferida, o que minimizaria os riscos de desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas.

8. REFERÊNCIAS

- 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.
- Andrade, A.G., Lima, C.F., Albuquerque, A.K.B. **Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica.** Revista Brasileira de Queimaduras. 2010; 9 (1): 21-30.
- Badawy, M.E.I., Rabea, E. **A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection.** International Journal of Carbohydrate Chemistry. 2011; 29.
- Bajay HM, Araújo IEM. **Registro da evolução de feridas: elaboração de um instrumento.** Rev Gaúch Enferm. 2003; 24 (2): 196-208.
- Balbino, Carlos Alberto; Pedreira, Leonardo Madeira; Curi, Rui. **Mecanismos Envolvidos na Cicatrização: Uma Revisão.** Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas. 2005; 41 (1): 27-51.
- Barnett SE, Varley SJ. **The effects of calcium alginate on wound healing.** Ann R Coll Surg Engl. 1987; 69 (4): 153-5.
- 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; 83(2): 87-93.
- Bernkop-Schnürch, A. Dünnhaupt, S. **Chitosan-based drug delivery systems.** [European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics](#). 2012; 81(3): 463–469.
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M. **Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review.** Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008; 97(8).
- 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.** Wound Repair Regen. 2008; 16(3): 425-31.
- Chen, L., Tang, Chang-yu., Ning, Nan-ying., Wang, Chao-yu., Fu, Q., Zhang, Q. **PREPARATION AND PROPERTIES OF CHITOSAN/LIGNIN COMPOSITE FILMS.** Chinese Journal of Polymer Science. 2009; 27(5): 739–746.
- Correa, F., R.A. Lopes Martins, J.C. Correa, V.V. Iversen, J. Joenson, J.M. Bjordal, **Low-level laser therapy (GaAs lambda = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis,** Photomed. Laser Surg. 2007; 25 245–249.
- Dadpay, M., Sharifian, Z., Bayat, Mohammad., Bayat, Mehrnoush., Dabbagh, Ali. **Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats by**

biomechanical evaluation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: 2012; 111, 1–8.

Diegelmann, Robert F.; Evans, Melissa C. **Wound healing: An overview of cute, fibrotic and delayed healing.** Frontiers in Bioscience. 2004; 9, 283-289.

Boschi, E.S., C.E. Leite, V.C. Saciura, E. Caberlon, A. Lunardelli, S. Bittencourt, D.A. Melo, J.R. Oliveira, **Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat,** Lasers Surg. Med. 2008; 40, 500–508.

Eaglstein, William H. **Tissue-engineered skin. Current status in wound healing.** American Journal of Clinical Dermatology. 2001; 2(5): 305-13.

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.

Goldberg, S.R., Diegelmann, R.F. **Wound Healing Primer.** [Critical Care Nursing Clinics of North America](#). 2012; 24(2): 165–178.

Hama, Chica; Umeda, Tomohiro; Musha, Yoshiro; Koda, Seiichiro; Itatani, Kiyoshi. **Preparation of novel hemostatic material containing spherical porous hydroxyapatite/alginate granules.** Journal of the Ceramic Society of Japan. 2010; 118(1378).

Hamblin MR, Demidova TN. **Mechanisms of low-level light therapy.** Proc of SPIE. 2006; 6140, 1-11

Hoyama, E.; Schellini, S. A.; Pellizon, C. H.; Marques, M. E. A.; Padovani, C.R.; Rossa, R. **Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável.** Anais Brasileiro de Dermatologia 2005; 80(4): 369-74.

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; 127(8): 2048-57.

Ikawa, A., Suzuki, Y., Yasoshima, A., Suzuki, N., Nakayama, H., Takahashi, S., Doi, K. **Age-related changes in the dorsal skin histology in Mini and Wistar rats.** Histol Histopathol. 2002; 17, 419-426.

Illum, L. **Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.** Pharm. Res. 1998; 15, 1326-133.

Jayakumar, R.,Prabaharan, M., Kumar, P.T.S., Nair, S.V., Tamura, H. **Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.** Biotechnology Advances. 2011; 29. 322–337.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. **Histologia Básica.** 11. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Júnior, E.M.L., Serra, M.C.V.F. **Tratado de Queimaduras**, Editora Atheneu, 2004.

Khan TA, Peh KK. **A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats**. J Pharm Pharm Sci. 2003; 6(1): 20-6.

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; 359(1-2): 79-86.

Kiwanuka, E., Junker, J., Eriksson, E. **Harnessing Growth Factors to Influence Wound Healing**. [Clinics in Plastic Surgery](#). Wound Healing for Plastic Surgeons. 2012; 39(3): 239–248.

Kordestani S, Shahrezaee M, Tahmasebi MN, Hajimahmudi 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; 17(7): 323-7.

Laranjeira, Mauro C. M., & Fávère, Valfredo T. de. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico**. *Química Nova*. 2009; 32(3): 672-678.

Leão, C.E.G., Andrade, E.S., Fabrini, D.S., Oliveira, R.A., Machado, B.G.L., Gontijo, L.C. **Epidemiology of burns in Minas Gerais**. Rev. Bras. Cir. Plást. 2011; 26(4): 573-7.

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.

Lee, Kuen Young., Mooney, David J. **Alginate: Properties and biomedical applications**. Progress in Polymer Science. 2012; 37: 106–126.

Mandelbaum, S.H., Santis, E.P.Di., **Mandelbaum, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I** An bras Dermatol, Rio de Janeiro. 2003; 78(4): 393-410.

Medrado, A.P, Soares, A.P, Santos, E.T, Reis, S.R, Andrade, Z.A. **Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing**. J Photochem Photobiol B. 2008; 92(3):144-52.

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

Melo, V.A., Anjos, D.C.S., Júnior, R.A., Melo, D.B., Carvalho, F.U.R. **Effect of low level laser on sutured wound healing in rats**. Acta Cirúrgica Brasileira. 2011; 26 (2): 129.

Mirshafiey, A; Khodadadi, A; Rehm, B.H; Khorramizadeh, M.R; Eslami, M.B; Razavi, A; Saadat, F. **Sodium alginate as a novel therapeutic option in experimental colitis**. Scand J Immunol. 2005; 61(4): 316-21.

Mulder, G; Wallin, K; Tenenhaus, M. **Regenerative Materials That Facilitate Wound Healing**. Wound Healing for Plastic Surgeons [Clinics in Plastic Surgery](#). 2012; 39(3): 249–267.

MULLER, José Miguel; SANTOS, Renata Lopes dos; BRIGIDO, Rivelí Vieira. **Produção de alginato por microrganismos**. Polímeros, São Carlos. 2011; 21(4).

Nes, A.G; Posso, M.B; **Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity Lasers**. Int Nurs Ver. 2005; 52: 68-72.

Nicolisi, J.G., Moraes, A. M. **Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.

No, H.K., Lee, K.S., Meyers, S.P. **Correlation Between Physicochemical Characteristics and Binding Capacities of Chitosan Products**. JOURNAL OF FOOD SCIENCE. 2000; 65(7).

Ong S.Y, Wu J, Moochhala S.M, Tan M.H, Lu J. **Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties**. Biomaterials. 2008; 29(32): 4323-32.

Othman, N., Kendrick, D. **Epidemiology of burn injuries in the East Mediterranean Region: a systematic review**. BMC Public Health. 2010.

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; 18(10): 1729-34.

Peh K, Khan T, Ch'ng H. **Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing**. J Pharm Pharm Sci. 2000; 3(3): 303-11.

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; 85(2): 566-72.

Piva, J.A. de A. C., Silva, V. dos S., Abreu, E.M. de C., Nicolau, R. A., **Ação da terapia laser de baixa potência nas fases de reparo tecidual: princípios básicos**. An. Bras. Dermatol. 2011; 86(5): 947-54.

Porter, Sue. **The role of the fibroblast in wound contraction and healing**. Wound healing Science. UK. 2007; 3(1).

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; 137(1): 171-8.

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; 3(3): 160-163.

Rao C.M, George K.M, Bairy K.L, Somayaji S.N. **An appraisal of the healing profiles of oral and external (gel) Metronidazole on partial thickness burn wounds Indian.** J Pharmacol. 2000; 32: 282-287.

Razavi A, Khodadadi A, Eslami M.B, Eshraghi S, Mirshafiey A. **Therapeutic effect of sodium alginate in experimental chronic ulcerative colitis.** Iran J Allergy Asthma Immunol. 2008; 7(1): 13-8.

Ribeiro M.S, Silva F, Araújo C.E, Oliveira S.F, Pelegrini C.M, Zorn T.M 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.

Ribeiro, M.A.G., Albuquerque Júnior, R.L.C., Barreto, A.L.S., Olibeira, V.G.M., Santos, T.B., Dantas, C.D.F. **Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² λ 660-nm laser irradiation.** Indian Journal of Dental Research. 2009; 20(3).

Ribeiro. M.A.G., Alquerque Júnior, R.L.C., Ramalho, L.M.P., Pinheiro, A.L.B., Bonjardim, L.R., Cunha, S.S. **Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm.** Photomedicine and Laser Surgery. 2009; 27(1).

Rodero, M.P., Khosrotehrani, K. **Skin wound healing modulation by macrophages.** Int J Clin Exp Pathol 2010; 3(7): 643-653.

Seaman, Susie. **Dressing Selection in Chronic Wound Management.** Journal of the American Podiatric Medical Association. 2002; 92(1).

Shakespeare P. **Burn wound healing and skin substitutes.** Burns. 2001; 27: 517-522.

Tazima, M.F.G.S., Vicente, Y.A.M.V.A., Moriya, T. **BIOLOGIA DA FERIDA E CICATRIZAÇÃO.** Medicina (Ribeirão Preto). 2008; 41(3): 259-64.

Thomas S. **A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing.** J Wound Care. 2008; 17(8): 349-52.

Thomas, A., Harding, K.G., Moore, K. **Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-α.** Biomaterials. 2000; 21, 1797-1802.

Thu, Hnin-Ei, Zulfakar, M.H., Ng, Shiow-Fern. **Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing.** International Journal of Pharmaceutics. 2012; 434, 375–383.

Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. **Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes.** Biomaterials. 2001; 22, 1667-1673.

Wang, T., Zhu, Xiao-Kang., Xue, Xu-Ting., Wu, Da-Yang. **Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings.** Carbohydrate Polymers. 2012; 88, 75–83.

Weller, C; Sussman, G. **Wound Dressings Update Journal of Pharmacy Practice and Research: Geriatric Therapeutics.** 2006; 36 (4): 318-324.

Wells, M.Y., Voute, H., Bellingard, V., Fisch, C., Boulifard, V., George, C. Picaut, P. **Histomorphology and Vascular Lesions in Dorsal Rat Skin Used as Injection Sites for a Subcutaneous Toxicity Study.** Toxicologic Pathology. 2010; 38, 258-266.

Widelitz, R.B., Jiang, Ting-Xin., Noveen, A., Ting-Barreth, S.A., Yin, E., Jung, Hn-Sung., Chuong, Cheng-Ming. **Molecular Histology in Skin Appendage Morphogenesis.** Microscopy Research and Technique. 1997; 38, 452–465.

Yasukawa A, Hroi 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; 69(8): 799-806.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da associação entre a laserterapia de baixa potência e filmes à base de quitosana e alginato de sódio no processo de reparo de queimaduras dérmicas em modelo roedor.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a intensidade da reação inflamatória.
- Determinar os índices percentuais de reepitelização.
- Quantificar o número médio de miofibroblastos e vasos sanguíneos neoformados.
- Descrever o padrão de deposição de fibras colágenas.
- Quantificar o grau de colagenização das feridas.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy

M.D.M. Dantas^a, D.R.R. Cavalcante^a, F.E.N. Araújo^a, S.R. Barretto^a, G.T.S. Aciole^b, A.L.B. Pinheiro^b, M.A.G. Ribeiro^c, I.B. Lima-Verde^a, C.M. Melo^a, J.C. Cardoso^a, R.L.C. Albuquerque Júnior^{a,*}

^aTiradentes University, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49030-490, Aracaju/SE, Brazil

^bFederal University of Bahia, Av. Araújo Pinto, 62, Canela, CEP 40110-150, Salvador/BA, Brazil

^cFederal University of Sergipe, Av. Mal. Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão/SE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2011

Received in revised form 25 June 2011

Accepted 30 June 2011

Available online 6 July 2011

Keywords:

Dressing
Polymers
Burn healing
Laser

ABSTRACT

This paper aimed to evaluate the improvement of burn wounds healing by sodium alginate/chitosan-based films and laser therapy. Natural polymers with different biological activities are widely used as film dressings to improve wound healing. Lasers arrays accelerate the healing repair of soft tissue injuries. Burn procedures were performed on the backs of 60 male rats assigned into six groups: untreated (CTR), dressed with cellulose films (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), laser-irradiated undressed wounds (LT), laser-irradiated wounds with cellulose (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based films (SCLT). Laser therapy was applied for 7 days. Animals of each group were euthanised 8 and 14 days after the burn procedures. The inflammatory reaction was significantly more intense in the CTR group than in the irradiated groups after 8 and 14 days. Laser therapy stimulated myofibroblastic differentiation in 8 days, with or without dressing films. Combined laser therapy and both dressings improved epithelisation, blood vessels formation and collagenization, promoted rapid replacement of type III for type I collagen and favored the better arrangement of the newly formed collagen fibres. The combination of laser therapy and sodium alginate/chitosan-based dressing improves burn healing, apparently by modulating the epithelisation, blood vessels formation and collagenization processes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The employment of natural polymers with different mechanical, physical and biological properties as wound dressings has been widely studied based on the many advantages of using these macromolecular agents, such as biocompatibility and their non-irritant and nontoxic properties [1,2]. In addition, wound dressings are thought to prevent loss of body fluid, to prevent exudate build-up, to protect the wounds from external contamination, to have sufficient bactericidal effects to inhibit infection and to prepare an optimum wound bed for autografting [3].

Chitosan is a cationic polysaccharide produced by alkaline N-deacetylation of chitin, with the sugar backbone of chitosan

composed of β -1,4-linked glucosamine units [4]. Chitosan is nontoxic and possesses several unique properties, such as biocompatibility and biodegradability, which make it an attractive candidate for pharmaceutical and biomedical applications. The development and characterisation of chitosan-based films have been previously described [5], and the films have been successfully used as wound dressings [6–9]. Additionally, this polymer has been shown to have potent haemostatic and antimicrobial properties [10].

Alginate is a highly absorbent, gel-forming, biocompatible polymer of guluronic and mannuronic acids used as a carrier for drug delivery and haemostatic wound dressing [11]. Despite the biological properties presented by both biomaterials, there are only a few recent reports that investigate the development of film-based dressings systems based on a combination of chitosan and sodium alginate [12].

Lasers emit a highly concentrated, non-invasive, non-ionising radiation that, when in contact with different tissues, promote thermal, photochemical and nonlinear effects [13]. Several studies have indicated that low level laser therapy (LLLT) modulates different biological activities, such as anti-inflammatory action [14,15], differentiation of fibroblasts into myofibroblasts [16,17], cell proliferation [18], angiogenesis [19] and collagen synthesis [20,21].

* Corresponding author. Address: Post-Graduating Program in Health and Environment, Tiradentes University (Sergipe/Brazil), Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49030-490, Aracaju/SE, Brazil. Tel.: +55 79 3218 2100x2615.

E-mail addresses: marxdantas@hotmail.com (M.D.M. Dantas), daniellercavalcante@hotmail.com (D.R.R. Cavalcante), fenaraujo@hotmail.com (F.E.N. Araújo), nanaestetica@oi.com.br (S.R. Barretto), gilberthaciole@hotmail.com (G.T.S. Aciole), albp@ufba.br (A.L.B. Pinheiro), endoribeiro@yahoo.com.br (M.A.G. Ribeiro), isabel_limaverde@yahoo.com.br (I.B. Lima-Verde), claudiamouramelo@hotmail.com (C.M. Melo), juliana@itp.org.br (J.C. Cardoso), ricardo.patologia@uol.com.br (R.L.C. Albuquerque Júnior).

It has also been demonstrated that LLLT improves burn healing [22,23].

It has been recently demonstrated that the combination of wound dressings and phototherapy accelerate the biological events involved in the healing process [24]. Therefore, the goal of this study was to investigate the effect of the combination of LLLT and sodium alginate/chitosan-based films (SC films) on burn healing in rodents.

2. Material and methods

2.1. Preparation of the sodium alginate/chitosan-based films (SC films)

Polymeric dispersions (1% w/w) were prepared by dissolving chitosan and sodium alginate separately in a diluted acetic acid (0.5 M) solution at room temperature ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Glycerol was added to the chitosan dispersion (20% w/w of polymer weight) as a plasticiser. The chitosan dispersion was sonicated to remove air bubbles, dropped into a Petri dish (10.0 mL) and dried thereafter. Subsequently, 10.0 mL of sodium alginate dispersion was cast over the chitosan film and the solvent was allowed to evaporate. The resulting films were manually peeled off and then cut into samples of $20\text{ mm} \times 20\text{ mm}$.

2.2. Animals

Prior to beginning any experimental procedures, this study was approved by our Animal Care and Use Committee (register 040508). In accordance to the institution's guidelines outlined in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", all animals received humane care during all steps of the experimentation. Furthermore, the study protocols were approved by National Research Council prior to beginning the experiments.

The animals used in this experiment were adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar strain, weighing $250\text{ g} \pm 50\text{ g}$. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding and were supplied with food and water *ad libitum* in a temperature and humidity-controlled environment.

2.3. Burning procedures and groups formation

Sixty rats were anaesthetised with an intraperitoneal ketamine-xylazine injection (100 mg/kg – 5 mg/kg) and 1 cm^2 burn wounds were created on the backs of the animals. This was accomplished using a brass probe that had been immersed in boiling ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) water until thermal equilibrium was achieved, which was then placed without pressure for 20 s on the previously shaved dorsal region of the rats [25]. The animals were handled in accordance with aseptic principles in order to avoid exogenous bacterial contamination. Subsequently, the rats were randomly assigned into six groups of ten animals each, according to the treatment of the burn wounds: untreated (CTR), dressed with a commercially available cellulose film (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), undressed, laser-irradiated (LT), dressed with cellulose, laser-irradiated (CLLT) and dressed with sodium alginate/chitosan-based film (SCLT).

2.4. LLLT procedure

Animals were submitted to daily transcutaneous irradiation using a previously calibrated semi-conductor diode laser GaAlAs (Twin Laser[®], MMOptics, São Paulo, Brazil) with continuous emission at 780 nm wavelength for 100 s (25 S each point). The output power used was 40 mW, with a focal spot of 0.04 cm^2 , and power density of 1 W/cm^2 . The total energy per session was estimated in

4 J and the energy density was 20 J/cm^2 distributed in four different equidistant points (5 J/cm^2 each) over the course of 7 days. The first irradiation was performed immediately after the burning procedures (Fig. 1).

2.5. Euthanasia and histological procedure

The sacrifice of the animals was performed using CO_2 chamber. After the sacrifice, the burn wounds were surgically removed and the specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded according to routine laboratory techniques. Subsequently, a series of $5\text{ }\mu\text{m}$ thick sections were obtained, stained in haematoxylin-eosin and picrosirius and submitted to immunohistochemical techniques.

2.6. Assessment of the inflammatory profile (IP)

Histological sections stained in haematoxylin-eosin were used for the descriptive analysis of the inflammatory profile (IP). The intensity of the inflammatory response was classified as follows: 0 (absence of inflammatory response), 1 (inflammatory cells representing less than 10% of the cell population observed within the wound area), 2 (inflammatory cells representing between 10% and 50% of the cell population observed within the wound area), and 3 (inflammatory cells representing more than 50% of the cell population observed within the wound area). Moreover, the inflammatory profile (IP) was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) or chronic (predominance of mononuclear cells) and graded as slighter/absent, moderate or severe.

2.7. Assessment of the epithelisation rates (ER)

In order to assess the epithelisation rate (ER), photomicrographs of the histological sections of the wounds (stained in HE) were taken from all the samples ($40\times$) and processed using software (ImageLab[®], Sof-tium, São Paulo, SP, Brazil). The total wound surface extent (TWE) was assessed, as well as the extent of the epidermal migration from the normal wound margin to the point where the migrating epithelium stopped processing (ME). ER (%) was determined as follows: $\text{ER}(\%) = (\text{ME} \times 100)/\text{TWE}$.

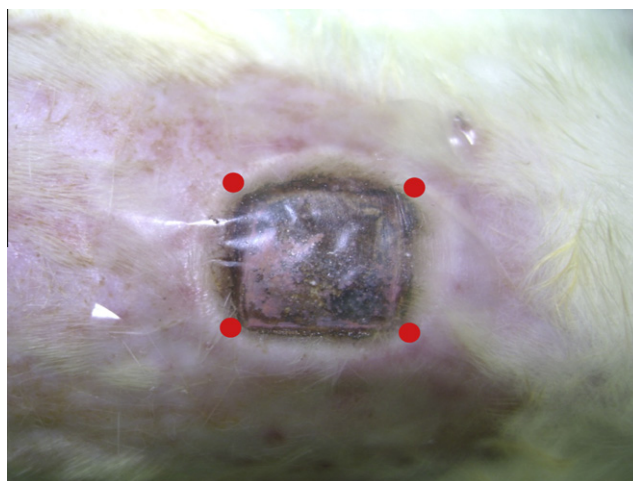


Fig. 1. Skin after the burn procedure showing the applied dressing and the four points treated with laser.

2.8. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts (MF) and blood vessel content (BV)

Myofibroblasts and blood vessels were detected using monoclonal antibodies against the α -smooth muscle actin antigen (α -SMA) (clone 1A4; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark) and the CD31 antigen (clone JC/70; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark), respectively. After washing in Phosphate-buffered saline solution (PBS), slides were incubated with biotin-labelled antimouse secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) then washed in PBS and incubated with peroxidase-labelled streptavidin (Dako). The reaction products were visualised by immersing the slides in freshly prepared diaminobenzidine (Dojindo, Kumamoto, Japan). Ten histological sections (400 \times magnification, 0.739 mm² per field) were randomly selected and the means of numbers of immunostained cells and vessels for a histological field were assessed with an image analysis system Imagelab[®] (Sof-tium, São Paulo, SP, Brazil) as previously described by Ribeiro et al. [17].

2.9. Descriptive morphological study of the collagenization

Histological sections stained in picosirius and analysed under polarised light were used for the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibres were categorised according to their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange/orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (reticular, parallel or interlaced).

2.10. Quantitative analysis of the collagenization rate (CR)

Quantization of the area occupied by collagen depositions in the healing area was determined by optical density in the image analysis system in different randomly selected fields. The system used consisted of a CCD Sony DXC-101 camera applied to an Olympus CX31 microscope, from which the images were sent to a monitor (Trinitron Sony). By means of a digitising system (Olympus C-7070 WIDEZOOM) the images were loaded onto a computer (Pentium 133 MHz) and processed using software (ImageTool). A total of 10 fields per case were analysed at a magnification of 100 \times . The thresholds for collagen fibres were established for each slide after enhancing the contrast up to a point at which the fibres were easily identified as birefringent (collagen) bands. The area occupied by the fibres was determined by digital densitometric recognition by adjusting the threshold level of measurement up to the different colour densities of the collagen fibres. The area occupied by the fibres was divided by the total area of the field. The results were expressed as a percentage of the skin area fraction occupied by the collagen fibres and described as collagenization rates (CR).

2.11. Statistical analysis

Statistical significance of the ER, MF, BV and CR quantitative measurements were assessed by analysis of variance (one-way ANOVA) and the Tukey test. The IP was analysed using the Kruskal Wallis and Dunn post hoc tests. Each time point was analysed separately, and two-tailed α -levels of $p \leq 0.05$ were regarded as significant.

3. Results

3.1. Analysis of the inflammatory profile (IP)

At 8 days, the inflammatory infiltrate was acute in the CTR group and subacute in the other groups. In 14 days, the infiltrate

was chronic in all of the groups (Fig. 2). The severity of the inflammatory infiltrate ranged from intense to moderate at 8 days and from moderate to absent at 14 days (Table 1). At 8 days, the IP was significantly more intense in the CTR group than in the LT ($p = 0.04$), CLLT ($p = 0.04$) and SCLT ($p = 0.04$) groups, but no other significant difference was evident among the groups, either at the 8- or 14-day mark ($p > 0.05$).

3.2. Analysis of the epithelisation rate (ER)

At 8 days, the ER was significantly higher in all the groups other than in the CTR group ($p < 0.01$), whereas the LT, CLLT and SCLT groups showed higher rates in comparison to the non-irradiated groups ($p < 0.05$). At 14 days, the ER was more advanced in the LT, CLLT and SCLT groups ($p < 0.05$). Additionally, the SCLT group was more effective in improving ER than were the LT and CLLT groups ($p < 0.05$) (Fig. 3).

3.3. Blood vessel content (BV)

CD31-positive blood vessels were identified by the brown stain (Fig. 4). At 8 days, the CL and SC groups showed significant increases in the blood vessel content compared to the CTR group ($p < 0.05$). However, all irradiated groups presented more conspicuous vascular content than did the non-irradiated groups, and the mean count of blood vessels was significantly higher in the SCLT group ($p < 0.05$). At 14 days, there was a clear reduction in the vascularisation process in all experimental groups, but the control group (CTR) showed a slight increase in the mean of newly formed blood vessels (Fig. 5).

3.4. Myofibroblasts content (MF)

A-SM-positive myofibroblasts were seen as brown spindle-shaped cells scattered in the connective tissue (Fig. 6). At 8 days, the LT, CLLT and SCLT groups showed a significant increase in MF. At 14 days, there was a clear decrease in the content of this cell subset in all the groups, but this reduction was significantly more conspicuous in the irradiated groups, irrespective the use of dressing films (Fig. 7).

3.5. Morphological analysis of collagenization

As shown in Fig. 8, at 8 days, collagen fibre deposition was unremarkable in the CTR group. In the CL group, extremely delicate greenish or yellow-greenish fibrillar structures (type-III collagen) with varied dimensions and reticular dispositions were observed. In the SC group, type-III collagen fibres were more distinguishable. The interfibrillar spaces were large and numerous in all three non-irradiated groups. In the LT, CLLT and SCLT groups, the bundles were longer and slightly wavy, with birefringence ranging from yellow to orange (type-I collagen), and tended to be arranged in a parallel disposition, but they were thicker and denser in the latter. At 14 days, the type I collagen fibres were thin, delicate and irregularly disposed in CTR but were arranged in a parallel manner in the CL group. In the SC and LT groups, the fibres were grosser and thicker and arranged in parallel dispositions, although some areas presented a slightly interlaced arrangement. The CLLT and SCLT groups presented dense, thick, grossly interlaced type-I collagen bundles, although the superficial fibres tended to show parallel dispositions, with scant interfibrillar spaces.

3.6. Quantitative analysis of the collagenization rate (CR)

As shown in Fig. 9, the quantitative analysis of the collagen deposition revealed that, at 8 days, the content of collagen fibres

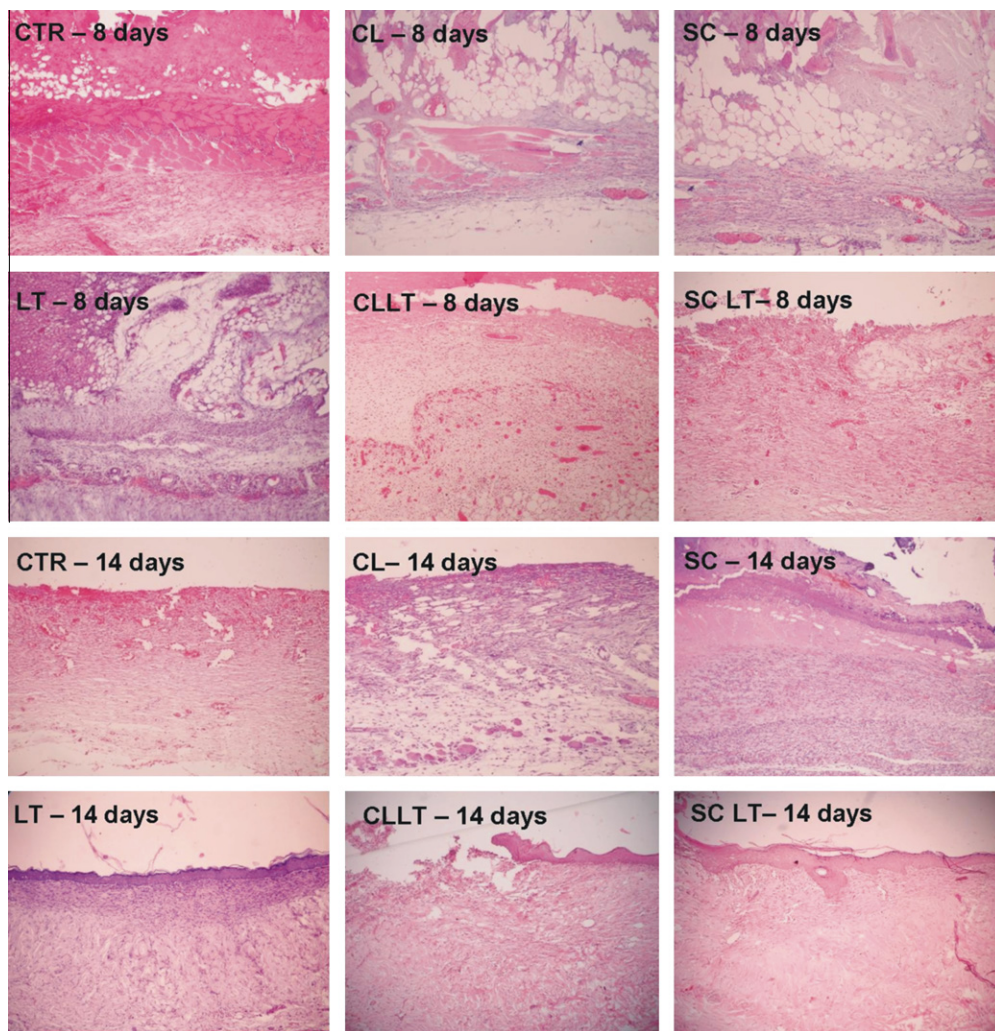


Fig. 2. Histological features of the burn wounds in 8 and 14 days untreated (CTR), dressed with commercial cellulose-based films (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), and laser-irradiated undressed (LT), cellulose-based dressed (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based dressed wounds (SCLT). The intense vascular content in CLLT and SCLT in 8 days and the absence of conspicuous inflammatory infiltrate in 14 days (HE, 100x).

Table 1

Analysis of the severity of the inflammatory infiltrate in the experimental groups on the 8th and 14th days.

Time	Animals	Groups					
		CTR	CL	SC	LT	CLLT	SCLT
8 days	R1	3	2	3	2	2	2
	R2	3	2	2	2	2	2
	R3	3	3	2	2	2	2
	R4	3	3	2	2	2	2
	R5	3	2	3	2	2	2
	R6	3	3	2	2	2	2
14 days	R1	2	2	1	0	1	0
	R2	2	1	0	0	0	0
	R3	2	1	1	0	0	0
	R4	1	2	1	1	0	1
	R5	2	1	2	0	0	0
	R6	3	2	1	1	1	1

(0) – inflammatory infiltrate is absent; (1) – mild inflammatory infiltrate corresponding to less than 10% of stromal cells; (2) moderate inflammatory infiltrate corresponding to more than 10 and less than 50% of stromal cells; (3) intense inflammatory infiltrate corresponding to more than 50% of stromal cells.

R1-R6 – animals from each experimental group (6 animals/group).

was significantly less expressive in the CTR group than in the LT ($p = 0.02$), CLLT ($p = 0.02$) and SCLT ($p = 0.01$) groups, but there

was no difference among the other groups. At 14 days, the collagenization rates in the CTR and CL groups were similar ($p = 0.55$) but

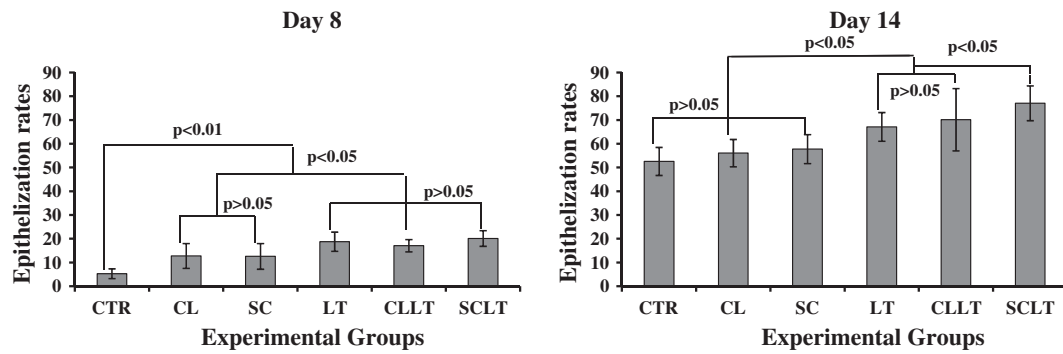


Fig. 3. Assessment of the epithelisation rates of the burn wounds after 8 or 14 days.

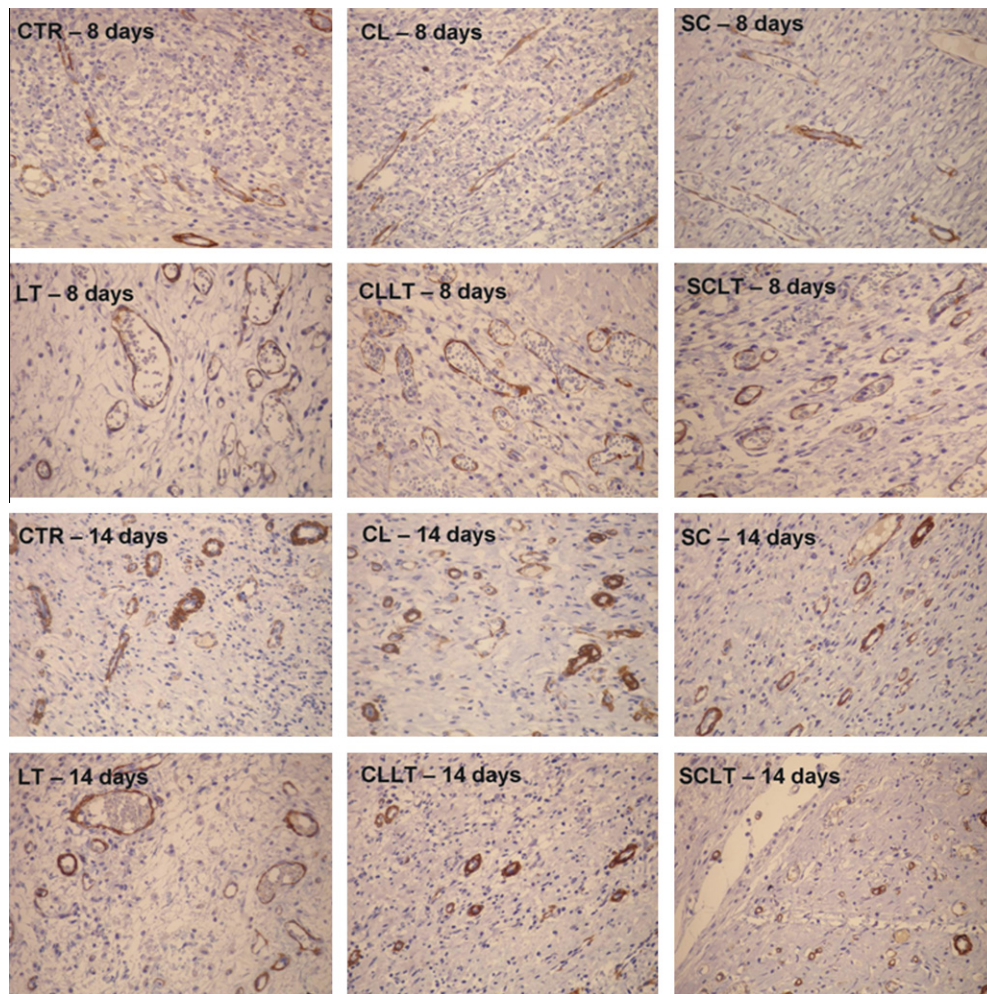


Fig. 4. Immunopositivity for CD 31 in the blood vessels within the burned area of the experimental groups. In 8 days the blood vessel content seemed more remarkable in the laser irradiated groups. In 14 days, the blood vessels appeared smaller, less congested and with thicker walls than in 8 days (LSA, 400x).

significantly less expressive than in the SC ($p = 0.01$ and 0.03), LT ($p = 0.00$ and 0.05), CLLT ($p = 0.00$ and 0.04) and SCLT groups ($p = 0.01$ and 0.05).

4. Discussion

Considering the fact that extensive burn wounds produce substantial skin epithelial denudation, the use of dressing films is very important in order to prevent loss of fluids and avoid external bac-

terial contamination [1,2,26]. In this study, the application of both types of dressing films on the burn wounds provided earlier chronicity of the inflammatory response, better epithelisation, improved blood vessels supply and collagenization compared to undressed wounds (CTR). The advantages of the use of cellulose dressing films on burn wounds are well established in experimental models [2] and clinical trials [27], but this is the first report asserting that sodium alginate/chitosan-based films (SCs) promote the very same biological activities in burn healing.

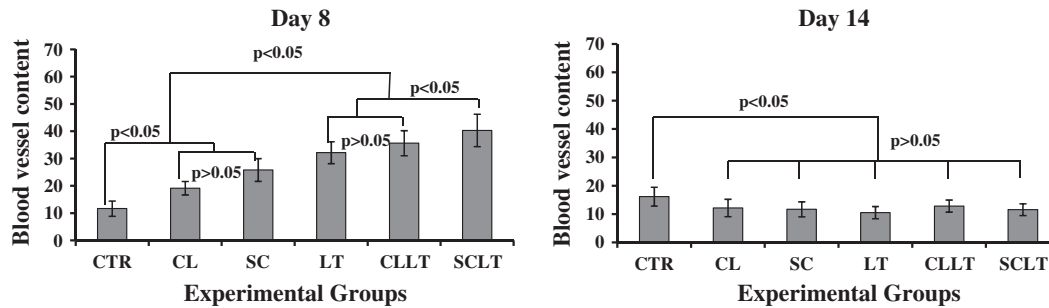


Fig. 5. Quantitative analysis of the immunostained blood vessel content within the wound area 8 and 14 days after the burn procedures.

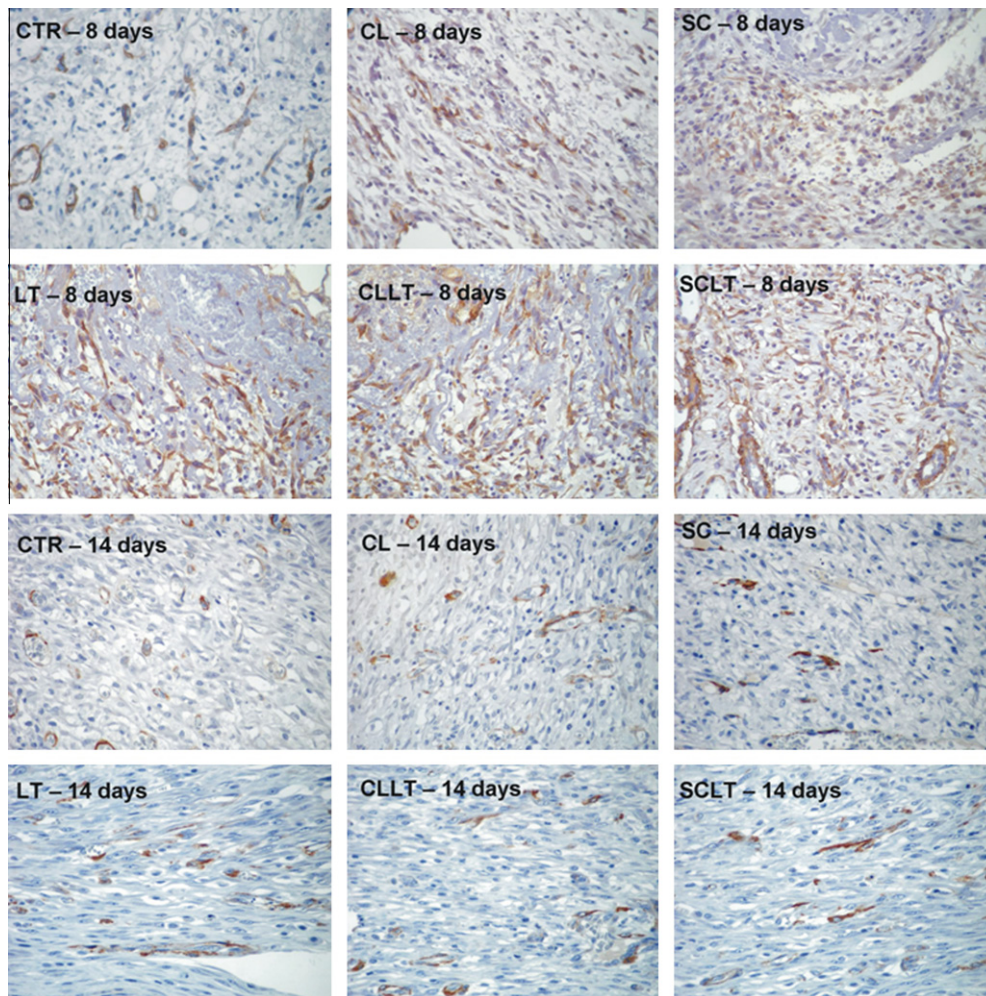


Fig. 6. Immunopositivity for α -SMA in myofibroblasts within the burned area of the experimental groups. The myofibroblasts are more evident and scattered in the connective tissue in 8 days, whereas in 14 days this cell subset is less abundant and appears to be disposed along the direction of the collagen bundles (LSAB, 400 \times).

The benefits of LLLT on the healing process have been extensively investigated [17,21–23]. In this study, LLLT provided a significant decrease in the severity of the inflammatory response, irrespective of the combination with the dressing films. This activity might be related to the inhibitory effect of laser energy on the release of prostaglandin and TNF- α [28], mast cell degranulation [29] and on lymphocytic proliferation [17]. LLLT also significantly improved angiogenesis and blood vessels formation, as reported in previous studies [19]. Additionally, it has been demonstrated that the more rapid onset of the vascular steps of wound healing improves dermal healing and scar formation [14,15,17,21,26].

The epithelisation process was more effective in irradiated groups as well. These findings are supported by previous studies asserting that LLLT stimulates the migration of keratinocyte along the healing wound surface *in vivo* [30] and provides keratinocyte proliferation *in vitro* [31].

Myofibroblasts are a cell type involved in wound contraction, which is a crucial event leading to the proper healing of larger wounds, with extensive loss of cells and tissue [16]. These cell subsets present a contractile phenotype characterised by a cytoskeleton rich in actin microfilaments, and they can be identified by immunohistochemistry due to their extensive positivity for α -

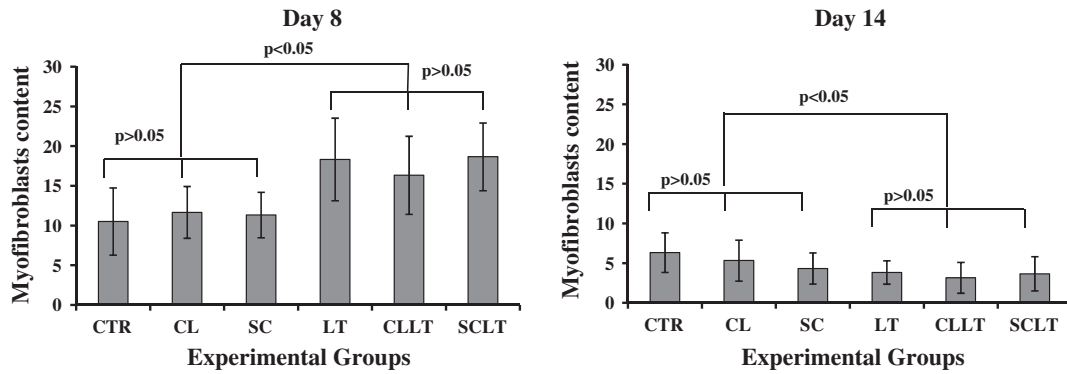


Fig. 7. Quantitative analysis of myofibroblasts content within the wound area 8 and 14 days after the burn procedures.

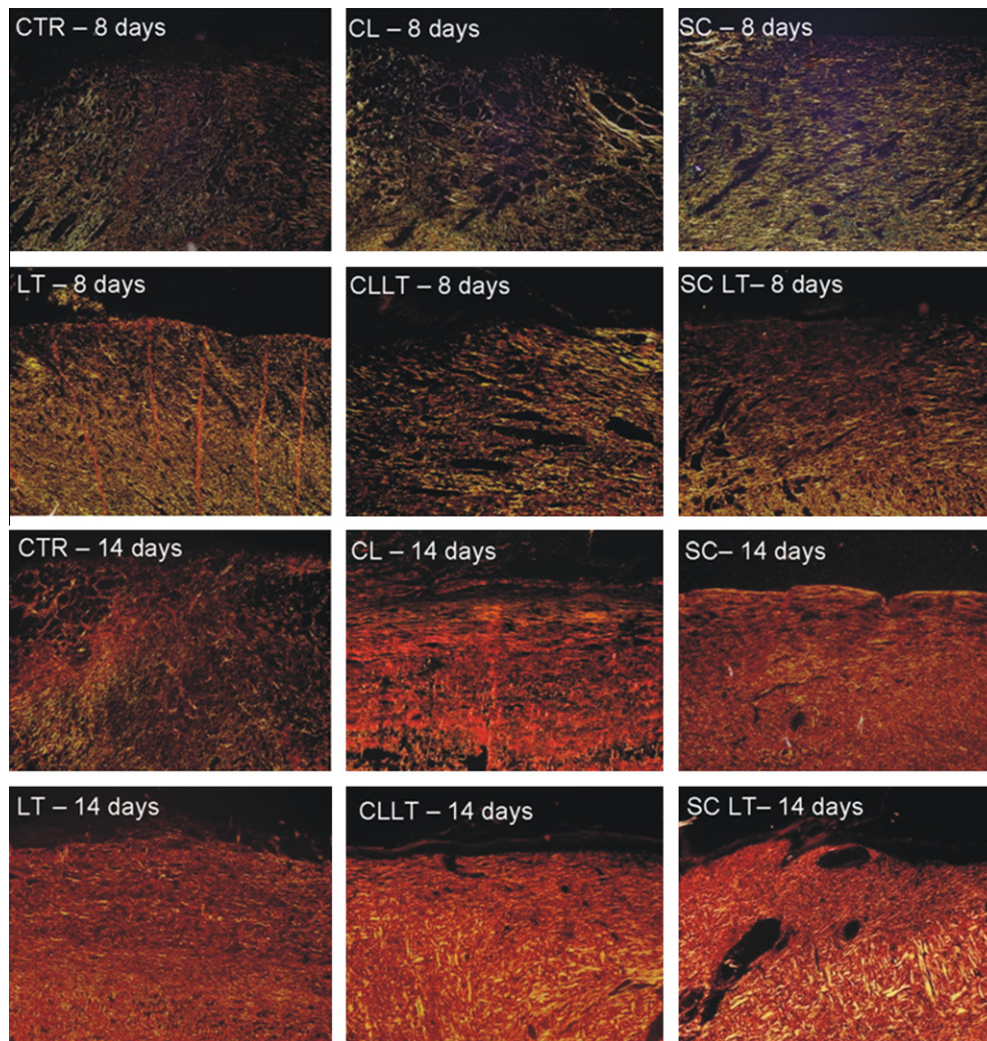


Fig. 8. Histological features of the burn wounds in 8 and 14 days untreated (CTR), dressed with commercial cellulose-based films (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), and laser-irradiated undressed (LT), cellulose-based dressed (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based dressed wounds (SCLT). The reticular arrangement of type III collagen fibres in CTR, CL, SC and LT, and a parallel disposition in CLLT and SCLT in 8 days. In 14 days, gross type I collagen fibres are compacted and interlaced in CLLT and SCLT, resembling the normal dermis (Sirius Red, 100x).

SMA (alpha smooth muscle actin) [17]. In this study, LLLT seemed to enable fibroblasts to undergo transformation into myofibroblasts. Although the precise mechanism is still unclear, it has been suggested that there is a possible correlation to laser-induced upregulation of keratin cytokines responsible for myofibroblastic

differentiation, such as TGF- β [16,17,32]. However, further investigations are still required to fully clarify the biochemical events underlying the laser-induced myofibroblastic differentiation.

In this study, LLLT promoted more rapid replacement of the immature type-III collagen for mature type-I collagen fibres and

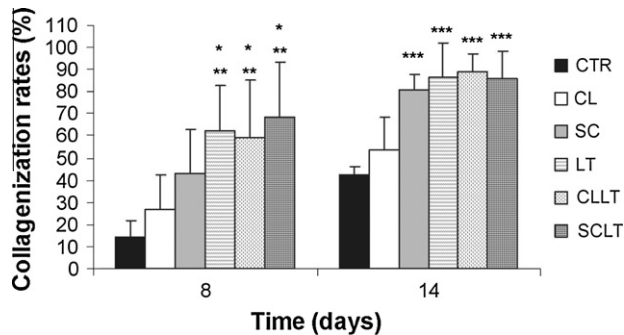


Fig. 9. Assessment of the collagenization rates of the burn wounds in 8 and 14 days.

*Significantly different from CTR ($p < 0.01$).

**Significantly different from CL ($p < 0.05$).

***Significantly different from CTR and CL ($p < 0.05$).

improved the collagenization rates at both 8 and 14 days. Similar stimulatory effects on the connective tissue during wound healing have been previously reported, attesting LLLT positive role in the collagen synthesis and remodelling [20,21]. Supporting these findings, previous studies have demonstrated that LLLT is able to upregulate the release of cytokines responsible for fibroblast proliferation and collagen synthesis, such as FGF- α and TGF- β , respectively [33,34].

It has been previously reported that the combination of cellulose-based films with LLLT may be quite advantageous for the healing process, supposedly because of the protective effects of the films combined with the wide range of biological activities induced by the laser irradiation [24]. However, this is the first report concerning the benefits of the combination of LLLT and sodium alginate/chitosan-based dressing films on burn healing. The beneficial synergism of these films and LLLT might have resulted from possible anti-inflammatory activities of chitosan and alginates, as long as both molecules are able to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [35,36]. Furthermore, antifungal [4] and antimicrobial properties [10] have already been reported to be associated with the beneficial effects of chitosan on wound healing.

This study also provided evidence that positive effect might be related to a possible improvement in the newly formed blood vessel content and epithelisation process. It has been demonstrated that chitosan is able to improve epithelial proliferation and granulation tissue formation during wound healing [37]. These properties were probably potentiated by LLLT biostimulatory activity. Additionally, the contents of the blood vessel were significantly reduced in the CLLT and SCLT groups at 14 days. These findings suggest that the combined usage of laser therapy and both dressing film types improved the blood vessels formation in the earlier phases of burn healing without inducing an undesirable longer-term maintenance of the vascular supply, which could impair the final scar formation.

Regarding collagenization, this combination resulted in more positive effects than the one noticed in the other groups. It has been demonstrated that LLLT not only improves the collagen deposition [21] but also provides better architectural organisation of the collagen fibres [20]. However, previous reports have also suggested an involvement of alginates in collagenization dynamics since these polymers are able to inhibit the activity of hyaluronidases, enzymes involved in the degradation and remodelling of the extracellular matrix [38]. Therefore, our findings regarding collagenization are possibly a result of the synergism between the biological activities provided by the laser and the chemical compounds of the SC films.

In conclusion, the combination of low level laser therapy and a sodium alginate/chitosan-based dressing was able to provide

substantial improvement in burn healing, particularly with regard to epithelisation and blood vessels supply, and it promoted the better arrangement and compact disposition of newly formed collagen fibres.

Acknowledgement

We would like to thank the Brazilian Council for Science and Research (CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa) for the financial support.

References

- [1] S. Kordestani, M. Shahrezaee, M.N. Tahmasebi, H. Hajimahmodi, D.H. Ghasemali, M.S. Abyaneh, A randomized controlled trial on the effectiveness of an advanced wound dressing used in Iran, *J. Wound Care*. 17 (2008) 323–327.
- [2] S. Thomas, A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing, *J. Wound Care*. 17 (2008) 349–352.
- [3] J.S. Lee, Y.S. Cho, J.W. Lee, H.J. Kim, D.G. Pyun, M.H. Park, T.R. Yoon, H.J. Leen, Y. Kuroyanagi, Preparation of wound dressing using hydrogel polyurethane foam, *Trends Biomater. Artif. Organs* 15 (2001) 4–6.
- [4] Y. Park, M.H. Kim, S.C. Park, H. Cheong, M.K. Jang, J.W. Nah, K.S. Hahn, Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2008) 1729–1734.
- [5] K. Peh, T. Khan, H. Chung, Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2000) 303–311.
- [6] T.A. Khan, K.K. Peh, A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2003) 20–26.
- [7] C. Alemdaroğlu, Z. Değim, N. Çelebi, F. Zor, S. Öztürk, D. Erdoğan, An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor, *Burns* 32 (2006) 319–327.
- [8] G.D.H. Rao, N.N. Balasubramanian, B.J. William, S. Prathaban, Clinical evaluation of chitin and chitosan in the management of wounds, *Tamilnadu, J. Vet. Animal Sci.* 3 (2007) 160–163.
- [9] M. Burkatovskaya, A.P. Castano, T.N. Demidova-Rice, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice, *Repair Regen.* 16 (2008) 425–431.
- [10] S.Y. Ong, J. Wu, S.M. Moochhala, M.H. Tan, J. Lu, Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials* 29 (2008) 4323–4332.
- [11] J.O. Kim, J.K. Park, J.H. Kim, S.G. Jin, C.S. Yong, D.X. Li, J.Y. Choi, J.S. Woo, B.K. Yoo, W.S. Lyoo, J.A. Kim, H.G. Choi, Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone, *Int. J. Pharm.* 359 (2008) 79–86.
- [12] H.N. Pei, X.G. Chen, Y. Li, H.Y. Zhou, Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 85 (2008) 566–572.
- [13] M.R. Hamblin, T.N. Demidova, Mechanisms of low-level light therapy, *Proc. SPIE*. 6140 (2006) 1–11.
- [14] F. Correa, R.A. Lopes Martins, J.C. Correa, V.V. Iversen, J. Joenson, J.M. Bjordal, Low-level laser therapy (GaAs lambda = 904 nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 245–249.
- [15] E.S. Boschi, C.E. Leite, V.C. Saciura, E. Caberlon, A. Lunardelli, S. Bittencourt, D.A. Melo, J.R. Oliveira, Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 500–508.
- [16] A.P. Medrado, L.S. Pugliese, S.R. Reis, Z.A. Andrade, Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 32 (2003) 239–244.
- [17] M.A. Ribeiro, R.L. Albuquerque, L.M. Ramalho, A.L. Pinheiro, L.R. Bonjardim, S.S. Da Cunha, Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm, *Photomed. Laser Surg.* 27 (2009) 49–55.
- [18] W.P. Hu, J.J. Wang, C.L. Yu, C.C. Lan, G.S. Chen, H.S. Yu, Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2048–2057.
- [19] A.V. Corazza, J. Jorge, C. Kurachi, V.S. Bagnato, Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 102–106.
- [20] A.P. Medrado, A.P. Soares, E.T. Santos, S.R. Reis, Z.A. Andrade, Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing, *J. Photochem. Photobiol. B*. 92 (2008) 144–152.
- [21] M.A.G. Ribeiro, R.L.C. Albuquerque, A.L.S. Barreto, V.G.M. Oliveira, T.B. Santos, C.D.F. Dantas, Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation, *Indian J. Dent. Res.* 20 (2009) 390.
- [22] M.S. Ribeiro, F. Silva, C.E. Araújo, S.F. Oliveira, C.M. Pelegrini, T.M. Zorn, D.M. Zezell, Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: a light microscopy study, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 22 (2004) 59–66.

- [23] M. Bayat, M.M. Vasheghani, N. Razavi, Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats, *J. Photochem. Photobiol. B.* 83 (2006) 87–93.
- [24] L.P. Soares, M.G. Oliveira, A.L. Pinheiro, B.R. Fronza, M.E. Maciel, Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat, *Photomed. Laser Surg.* 26 (2008) 10–13.
- [25] M. Hosnuter, A. Gurel, O. Babuccu, F. Armutcu, E. Kargi, A. Isikdemir, The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury, *Burns* 30 (2004) 121–125.
- [26] R.L.C. Albuquerque-Júnior, A.L.S. Barreto, J.A. Pires, P.F. Reis, S.O. Lima, M.A.G. Ribeiro, J.C. Cardoso, Effect of bovine type-I collagen based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model, *Int. J. Morphol.* 27 (2009) 1105–1110.
- [27] H.R. Alves, P.C. Almeida, V.A. Grillo, P. Smaniotto, D.V. Santos, M.C. Ferreira, Clinical experiences of using a cellulose dressing on burns and donor site wounds, *J. Wound Care* 18 (2009) 27–30.
- [28] Y. Sakurai, M. Tamaguchi, Y. Abiko, Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts, *Eur. J. Oral Sci.* 108 (2000) 29–34.
- [29] M.C.M.C. Pereira, C.B. Pinho, A.R.P. Medrado, Z.A. Andrade, S.R.A. Reis, Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries, *J. Photochem. Photobiol. B* 98 (2010) 188–192.
- [30] A.C. Freitas, A.L. Pinheiro, P. Miranda, F.A. Thiers, A.L. Vieira, Assessment of inflammatory effect of 830 laser light using C-reactive protein levels, *Bras. Dent. J.* 12 (2001) 187–190.
- [31] F.P. Eduardo, D.U. Mehnert, T.A. Monezi, D.M. Zezell, M.M. Schubert, C.P. Eduardo, M.M. Marques, Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser, *Lasers Surg. Med.* 39 (2007) 365–372.
- [32] T.N. Demidova-Rice, E.V. Salomatina, A.N. Yaroslavsky, I.M. Herman, M.R. Hamblin, Low-level light stimulates excisional wound healing in mice, *Lasers Surg. Med.* 39 (2007) 706–715.
- [33] A.N. Pereira, C.D.E.P. Eduardo, E. Matson, M.M. Marques, Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 31 (2002) 263–267.
- [34] M.C.M.C. Pereira, C.B. Pinho, A.R.P. Medrado, Z.A. Andrade, S.R.A. Reis, Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries, *J. Photochem. Photobiol. B.* 98 (2010) 188–192.
- [35] S.E. Barnett, S.J. Varley, The effects of calcium alginate on wound healing, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 69 (1987) 153–155.
- [36] M.S. Kim, M.J. Sung, S.B. Seo, S.J. Yoo, W.K. Lim, H.M. Kim, Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid beta peptide and interleukin-1beta, *Neurosci. Lett.* 321 (2002) 105–109.
- [37] I.A. Alsarra, Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds, *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (2009) 16–21.
- [38] M. Asada, M. Sugie, M. Inoue, K. Nakagomi, S. Hongo, K. Murata, S. Irie, T. Takeuchi, N. Tomizuka, S. Oka, Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1997) 1030–1032.