



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO REPARO DE
QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU SUBMETIDAS
AO TRATAMENTO COM MEMBRANA DE CELULOSE
MICROBIANA ASSOCIADA AO LASER AlGaInP
A660nm EM RATOS ALBINOS WISTAR**

MANUELA PIMENTEL NOIA

**Salvador - Bahia - Brasil
2009**



004091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

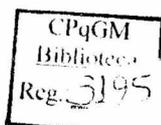
**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO REPARO DE
QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU SUBMETIDAS
AO TRATAMENTO COM MEMBRANA DE CELULOSE
MICROBIANA ASSOCIADA AO LASER AlGaInP
λ660nm EM RATOS ALBINOS WISTAR**

MANUELA PIMENTEL NOIA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Gonçalves Ramos

**Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Patologia Experimental**

**Salvador-Bahia-Brasil
2009**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Noia, Manuela Pimentel
N782a Análise morfológica do reparo de queimaduras de segundo grau submetidas ao
tratamento com membrana de celulose microbiana associada ao laser AlGaInPA660nm em
ratos albinos wistar / Manuela Pimentel Noia. -2009.
103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia. Curso de Pós - Graduação em Patologia Experimental, 2007.
Orientador: Prof.Dr. Eduardo Antonio Gonçalves Ramos.

1. Queimaduras. 2. Laser. 3. Membrana de Celulose. 4. Tratamento. I. Título.

CDU 544.54: 547.458.8

PR
117 845
2009

544.54:547.458.8
117845

LILDBI

"ANÁLISE MORFOLÓGICA DO REPARO DE QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU SUBMETIDAS
AO TRATAMENTO COM MEMBRANA DE CELULOSE MICROBIANA ASSOCIADA AO LASER
AlGalnP λ 660nm EM RATOS ALBINOS WISTAR"

MANUELA PIMENTEL NÓIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor Associado I
UFBA



Dr^a Alena Ribeiro Alves Peixoto
Professora Adjunta
EBMSP



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dedicatória

À minha mãe Dagmar Braga Pimentel Noia, pelo exemplo de vida e perseverança dado durante toda a minha existência e pelo amor incondicional presente em todos os momentos e ao meu pai Aurino Figueiredo Noia, meu grande amigo e referencia de caráter e força, por todo o seu amor e dedicação. Simplesmente devo tudo à vocês dois!

Agradecimentos

À Deus pela centelha divina que me deu a chama da vida

Ao meu orientador Professor Dr Eduardo Antônio Gonçalves Ramos, um exemplo de ser humano, por toda a perícia, sabedoria e paciência, que me fizeram amadurecer enquanto profissional e me tomar apta a receber o título de mestre

Ao Professor Dr Antonio Luiz Barbosa Pinheiro por me oferecer a primeira oportunidade no meio científico abrindo os meus horizontes para a minha carreira acadêmica

À Professora Dra Aparecida Maria de Cordeiro Marques por ter acreditado que eu era capaz de conquistar este sonho

À Professora e amiga Clarissa Araújo Gurgel Rocha pela amizade preciosa e pelo compartilhamento de valiosos conhecimentos estatísticos e científicos

À Tecnologista Sênior do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e amiga Ana Maria da Silva Carvalho pela amizade e companheirismo e pelo imprescindível auxílio técnico-científico no Laboratório de imuno-histoquímica

À Técnica Cristina Maria Mota Vasconcelos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e amiga pelo carinho, amizade e presteza e pelo também imprescindível auxílio técnico no Laboratório de imuno-histoquímica

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO REPARO DE QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM MEMBRANA DE CELULOSE MICROBIANA ASSOCIADA OU NÃO AO LASER AlGaInP λ 660nm EM RATOS ALBINOS WISTAR

RESUMO

As queimaduras de um modo geral apresentam altas incidências no Brasil e no mundo, culminando, em muitos casos, em necessidade de atenção hospitalar. Muitas alternativas terapêuticas tem sido propostas no sentido minimizar o sofrimento dos pacientes que são acometidos por este tipo de agressão, dentre elas está a membrana de celulose microbiana, detentora de propriedades peculiares que a tornam um material altamente promissor na aceleração do processo cicatricial bem como a terapia Laser de baixa potencia, conhecidamente, eficiente na biomodulação de processos biológicos. Levando em consideração a escassez de estudos experimentais que contemplem as queimaduras, em especifico, as de segundo grau, bem como a associação da laserterapia a membrana de celulose microbiana no tratamento destas, o presente estudo teve como objetivos estabelecer um modelo experimental capaz de reproduzir uma queimadura de segundo grau e avaliar histologicamente do processo de reparo dessas lesões induzidas em dorso de ratos e submetidas a tratamento com membrana de celulose associada ao Laser AlGaInP, 660nm, 40mW. Para este fim foram utilizados 64 ratos *Wistar albinus* machos divididos em 4 grupos: Controle: sem tratamento (n=16); GI: Tratado com Laser (n=16); GII: Tratado com Membrana (n=16) e GIII: Tratado com Membrana e Laser (n=16). Uma queimadura quadrada padronizada de 4cm² foi induzida no dorso dos ratos de todos os grupos. Após a realização da queimadura foi aplicada a membrana de celulose microbiana; nos grupos pré-estabelecidos o protocolo de laserterapia foi executado, imediatamente após a queimadura e a cada 48 horas com a dosimetria de 20J/cm² por sessão, até o sacrifício, que se deu em 24h, 3, 7 e 14 dias. Os espécimes foram fixados em formalina tamponada e processados histologicamente pelas colorações H/E, Picrosírius e Orceína, sendo posteriormente realizada a análise microscópica e estatística dos dados (testes de Kolmogorov Smirnov e Exato de Fisher). Ao final da análise dos resultados apesar de não haverem diferenças relevantes estatisticamente, foi observada um aumento da quantidade de vasos neoformados e edema de graduação intensa, no grupo tratado apenas com Laser em especial no sétimo dia experimental e uma redução marcante das fibras elásticas a medida que o experimento evoluía, em todos os grupos estudados. Um resultado interessante verificado neste estudo foi a presença de adipócitos na derme reticular superficial. Dessa forma concluímos que: O modelo proposto foi capaz de reproduzir a queimadura de segundo grau; Independente da modalidade de tratamento empregada a queimadura de segundo foi por si só capaz de induzir a redução das fibras elásticas na pele de ratos; A agressão representada pela queimaduras de segundo grau parece ter sido responsável pelo surgimento de células adiposas na derme até o sétimo dia experimental.

Palavras chave: Queimaduras, Laser, Celulose, Biomateriais, Reparo

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEALING OF SECOND DEGREE BURNS TREATED WITH MICROBIANE MEMBRANE AND AlGaInP 660 nm LASER IN WISTAR RATS.

ABSTRACT

In general, there are great incidences of cutaneous burns in Brazil and worldwide, and very often, there is a need for the hospitalization of patients. In the last few years, many alternative therapies have been proposed to minimize the suffering of patients who are affected by this type of injury. Among them is the microbial cellulose membrane which holds unique properties making it a promising material in accelerating the healing process. On the other hand, the low-level-laser therapy is known as an efficient modulator of biological systems. Taking literature into account, there are very few experimental studies focusing on cutaneous burns, particularly the second-degree related and also the association of laser therapy and the microbiane cellulose membrane in the treatments of these lesions. Therefore, the present study is aimed at establishing an experimental model for cutaneous second degree burns and to histologically evaluate the healing process of these kind of lesions induced in the dorsal surface of wistar rats subjected to treatment with micobial microbiane cellulose membrane associated or not with AlGaInP Laser, 660nm, 40mW. For that purpose, we used 64 male Wistar albinos rats placed into four groups: Control: with no treatment (n=16), GI: Treated with laser (n=16), GII: Treated with membrane (n=16), and GIII: Treated with laser and membrane (n=16). A standard 4 cm² bum was inflicted on the back skin of all the rats in each group. According to the experimental groups, the microbiane cellulose membrane was applied to the burnt area of the animals and the established Laser protocol was immediately run after the surgical procedures, and later on every 48 hours with a dose of 20J/cm². The animals/specimen were sacrificed under CO₂ atmosphere at 24 hours, three , seven and 14 days. The skin samples were fixed in buffered formalin, embedded in parafin and histological slides with 4 μ thick were prepared. These slides were stained in HE, Sirius Red and Orcein and analysed by light microscopy. Data were statistically analysed (Kolmogorov Smirnov and Fisher's Exact tests). Despite the absence of statistical significance (maybe due to the small number of rats per group) the results showed an higher number of newly formed blood vessels and exacerbated edema after seven days in the group treated only with Laser. All groups exhibited a reduction of elastic fibers which became more evident at the end of the experiments. One interesting result was the presence of addipose cells inside the reticular dermis in all the groups. We concluded that: The proposed experimental model was able to reproduce a second degree skin burn;The second degree burn induced the reducing of the elastic fibers; The injury represented by the burn might be responsible for the presence of adipocytes in the dermis till the seventh experimental day.

Keywords: Burns, Laser, Cellulose, Biomaterials, Wound healing.

LISTA DE ABREVIATURAS

AlGaInP	Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio
°C	Medida de temperatura - graus Celsius
DE	Densidade de energia
EGF	Epithelial Growth Factor
H/E	Hematoxilina/Eosina
He-Ne	Helio-Neônio
mW	Miliwatts: Unidade de medida para a aferição de potência equivalente a 10^{-3} watts
nm	Nanômetro: Unidade de medida equivalente a 10^{-9} metros
\int	Representação simbólica da grandeza física Trabalho
λ	Representação simbólica da grandeza comprimento de onda
®	Representação simbólica de Marca registrada
PVPI	Iodo Polivinilpirrolidona
\emptyset	Representação simbólica de tamanho do spot, área do feixe de luz emitido pelo aparelho Laser ou da ponta ativa da caneta emissora
s	Segundo
mg/Kg	Razão entre as unidades de medida de massa miligrama e quilograma
cm ²	Centímetro quadrado: Unidade de medida de área
P	Grandeza física Potência
Laser	Acrônimo da palavra <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A- Equipamentos utilizados para indução da queimadura: termômetro, aquecedor, aparelho para indução da queimadura; B- Ponta ativa do instrumento indutor da queimadura de segundo grau com orifício para adaptação do termômetro de mercúrio; C- Assepsia pré-cirúrgica do dorso tricotomizado com solução de PVPI a 1%; D- Aparelho Twin Laser MM Optics/São Carlos-SP e óculos de proteção; E- Irradiação com o Twin Laser $\lambda 660\text{nm}$ 40mW/20J/cm ² ; E- Lesão após microabrasão com bisturi F- Curativo com Membrana de biocelulose, (Salvador/Bahia, 2009).	44
Figura 2: Representação gráfica da regeneração epitelial nos grupos experimentais após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	56
Figura 3: Representação gráfica da regeneração epitelial nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	56
Figura 4: Representação gráfica da fibrose nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	57
Figura 5: Representação da fibrose nos grupos experimentais após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	57
Figura 6: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	58
Figura 7: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	58
Figura 8: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	59
Figura 9: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	59
Figura 10: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	59
Figura 11: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	59
Figura 12: Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 24h (Salvador/ Bahia, 2009)	60
Figura 13: Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)	61

- Figura 14:** Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009) 62
- Figura 15:** Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 24 horas (Salvador/ Bahia, 2009) 62
- Figura 16:** Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009) 63
- Figura 17:** Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009) 63
- Figura 18:** Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009) 63
- Figura 19:** Análise histomorfológica do grupo controle submetido apenas a queimadura de segundo grau. (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a presença da crosta fibrinoneutrófila (seta) e os anexos cutâneos preservados (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo em grau intenso após 24h (seta), lingüeta epitelial indicando inicio de reepitelização e presença de adipócitos em grau discreto na derme reticular (seta) (H/E 100X); (C) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial (seta) (H/E 40X); (D) Lingüeta epitelial indicando regeneração epidérmica após 3 dias (seta) (H/E 100X) (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Presença de fibrose jovem (seta) após 7 dias (H/E 100X) e acantose intensa com hiperqueratose; (G) e (H) Fibrose ainda jovem (seta), preservação dos anexos cutâneos e regeneração epitelial ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, (Salvador/Bahia, 2009) 69
- Figura 20:** Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo controle submetido apenas à queimadura de segundo grau (A) Adensamento das fibras colágenas, representado pela coloração mais escura, identificado após 3 dias (seta) (Picrosírius 100X); (B) Fibrose jovem após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosírius 100X); (C) Fibrose ainda jovem após 14 dias (seta) (Picrosírius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), (Salvador/Bahia, 2009) 71

Figura 24: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo II, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias (seta) (Picrosirius 100X); (B) Fibrose jovem após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose ainda jovem após 14 dias (seta) (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução moderada das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular (seta) e presença de células adiposas na derme reticular (círculo), após 7 dias (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), (Salvador/Bahia, 2009).

Figura 25: Análise histomorfológica do grupo III, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose e terapia Laser. (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a adesão da membrana à crosta fibrinoneutrófila (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo intenso e de células adiposas na região perianexial da derme reticular em grau discreto após 24h (círculo) (H/E 100X); (C) Após 3 dias, regeneração epitelial parcial e infiltrado inflamatório misto em grau discreto (seta) e presença de células adiposas na derme reticular em grau discreto (círculo); (D) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial e infiltrado inflamatório misto em grau discreto (seta) (H/E 40X e 100X), respectivamente; (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Regeneração epitelial completa e infiltrado inflamatório misto discreto (seta) após 7 dias (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose moderada, ainda jovem, (seta) e regeneração epitelial completa ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, (Salvador/Bahia, 2009)

Figura 26: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo III, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose e terapia Laser (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias (seta) e foco de metaplasia adiposa (círculo) (Picrosirius 100X); (B) Fibrose jovem, em grau moderado, após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose ainda jovem, em grau moderado, após 14 dias (seta) (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), (Salvador/Bahia, 2009).

Figura 21: Análise histomorfológica do grupo I submetido a queimadura de segundo grau e submetido a terapia Laser (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a presença da crosta fibrinoneutrofílica (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo intenso após 24h (H/E 100X); (C) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque a crosta fibrino-neutrofílica espessada e a presença de infiltrado inflamatório agudo discreto (seta) e presença de células adiposas na derme reticular (círculo) (H/E 40X); (D) Aglomerado anormal de células adiposas na derme reticular após 3 dias (círculo) (H/E 100X) (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa e a presença de edema intenso e discreto infiltrado inflamatório crônico na derme (seta) (H/E 40X); (F) Visão aproximada do edema com espaçamento das fibras e células do tecido conjuntivo ao lado de foco de infiltrado inflamatório crônico (seta), vasos sanguíneos proeminentes (seta) (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose ainda jovem em grau moderado (seta) e regeneração epitelial completa ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, (Salvador/Bahia, 2009)

Figura 22: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo Laser submetido à queimadura de segundo grau e a terapia Laser (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias, sem fibrose evidente (seta) (Picrosirius 100X); (B) Edema intenso provocando espaçamento das fibras colágenas após 7 dias (seta) ao lado de acantose epitelial (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose moderada, ainda jovem, após 14 dias (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa nas dermes papilar e reticular, respectivamente após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução intensa e discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (Orceína 200X), (Salvador/Bahia, 2009).

75

Figura 23: Análise histomorfológica do grupo II, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose. (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a adesão da membrana a crosta fibrinoneutrofílica (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo após 24h (seta) (H/E 100X); (C) e (D) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial (seta) (H/E 40X e 100X), respectivamente; (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Zonas com edema discreto (seta) e presença de células adiposas em grau moderado na derme reticular (círculo) após 7 dias (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose ainda jovem (seta) e regeneração epitelial ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, (Salvador/Bahia, 2009)

77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição do grupo Controle, submetido a queimadura de segundo grau, apenas	34
Tabela 2: Descrição do grupo I, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com Laser de baixa intensidade 660nm, 40mW/ 20J/cm ²	34
Tabela 3: Descrição do grupo II, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose	35
Tabela 4: Descrição do grupo III, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com Laser de baixa intensidade λ660nm 40mW/ 20J/cm ² associado a membrana biocelulose	35
Tabela 5: Codificação das amostras para análise cega dos resultados	41
Tabela 6: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na derme papilar durante período experimental	47
Tabela 7: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na derme reticular durante período experimental	49
Tabela 8: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na hipoderme durante período experimental	51
Tabela 9: Representação em percentuais das alterações das bordas epiteliais durante período experimental	53
Tabela 10: Avaliação da evolução da crosta fibrinoneutrófila em animais submetidos a queimaduras de segundo grau em função do tempo experimental e do tipo de tratamento empregado	55
Tabela 11: Análise estatística da evolução da regeneração epitelial nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher / BioEstat 4.0)	64
Tabela 12: Análise estatística da evolução da crosta fibrinoneutrófila nos grupos experimentais	64
Tabela 13: Análise estatística da evolução da acantose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0)	65
Tabela 14: Análise estatística da evolução da espongiose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0)	66
Tabela 15: Análise estatística da evolução da degeneração hidrópica nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0)	66
Tabela 16: Análise estatística da evolução da exocitose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0)	67
Tabela 17: Análise estatística da evolução da exocitose nos grupos experimentais (Teste Mann Whitney/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1.1 TECIDO CONJUNTIVO E MATRIZ EXTRACELULAR	17
1.1.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIO E CICATRICIAL	21
1.1.3 QUEIMADURAS	23
1.1.4 LASERTERAPIA	26
1.1.5 CELULOSE MICROBIANA	29
1.1.6 APLICABILIDADE DO LASER E DA CELULOSE MICROBIANA SOBRE QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU	31
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVOS GERAIS	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. CAUSUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	33
3.2 DELINEAMENTO	33
3.3 ANIMAIS	33
3.4 ESPAÇO FÍSICO PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	36
3.5 ENSAIO PILOTO	36
3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
3.7 CURATIVO COM A MEMBRANA DE CELULOSE MICROBIANA	37
3.8 LASERTERAPIA	38
3.8.1 CÁLCULO DA DENSIDADE DE ENERGIA (DE)	38
3.8.2 PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO	39
3.9 SACRIFICIO E COLETA DAS AMOSTRAS	40
3.9.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICA	40
3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	40
3.11 ANÁLISE CEGA DAS AMOSTRAS	41
3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA - PROTOCOLO	41
3.13 ANALISE MORFOMETRICA DOS MASTOCITOS NA LESAO	42
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADOS	45
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	45
4.1.1 ALTERAÇÕES CUTÂNEAS DE NATUREZA INFLAMATÓRIA	45
4.1.1.1 DERME PAPILAR	45
4.1.1.2 DERME RETICULAR	47
4.1.1.3 HIPODERME	49
4.1.2 ALTERAÇÕES DAS BORDAS EPITELIAIS	52
4.1.3 CROSTA FIBRINONEUTROFÍLICA	54
4.1.4 REGENERAÇÃO EPITELIAL	55
4.1.5 FIBRAS COLÁGENAS	56
4.1.6 FIBRAS ELÁSTICAS	58

4.1.7 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ADIPÓCITOS NA DERME RETICULAR	60
4.1.8 AVALIAÇÃO MORFOMETRICA DOS MASTOCITOS	61
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4.2.1 ALTERAÇÕES DE NATUREZA INFLAMATÓRIA	63
4.2.2 FIBROSE E FIBRAS ELÁSTICAS	63
4.2.3 REGENERAÇÃO EPITELIAL E CROSTA FIBRINO- NEUTROFÍLICA	64
4.2.4 ALTERAÇÕES DAS BORDAS EPITELIAIS	65
4.2.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ADIPÓCITOS NA DERME RETICULAR	65
4.2.3 ANALISE MORFOMETRICA DOS MASTOCITOS NA LESÃO	65
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Ao médico chefe da Unidade de Queimados do Hospital Geral do Estado Dr Carlos Henrique Brida por toda a atenção e auxílio prestado ao desenvolvimento desta tese

À amiga Elenilda Farias pela amizade preciosíssima e pela imensa contribuição prática e teórica fundamentais a realização e condução do presente estudo

À amiga Gentileza Neiva pela amizade e incentivo constante

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela oportunidade oferecida a mim para o desenvolvimento deste projeto

À equipe de profissionais da Pós- graduação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Tauar Sampaio, Taise Coutinho, Rosangela Paixão, Tatiane Dias pela paciência, competência, empenho e dedicação que tomaram o curso muito mais agradável a nós alunos

À CAPES pelo apoio financeiro que facilitou a concretização deste estudo

Aos meus colegas de turma Ana, André, Claire, Elen, Fábio, Glória, Gracio, Jaque, Zé, Juliana, Lidi, Lili, Mag, Marquinhos, Sanara, Sírio e Théo pelo companheirismo durante estes longos dois anos

À Fibrocel pela disponibilização das membranas NEXFILL® utilizadas neste estudo

À MM Optics pela confiança e disponibilização do aparelho Twin Laser utilizado no presente estudo

Aos funcionários da Histotecnologia Claudia, Elisângela, Elmir Mateus, Aline, Mariela, Maria Paula e Camila por todo o auxílio prestado durante a realização deste estudo

À minha mãe Dagmar Braga Pimentel Noia e ao meu pai Aurino Figueiredo Noia a quem dedico esta dissertação por toda a dedicação e participação neste longo processo

À grande amiga Juliana Borges Kopp pela longa e mais que valiosa amizade, pelo incentivo diário e confiança inabalável no meu sucesso

Aos meus queridos tios, tias, primos e primas em especial as tias Nira, Ira e Neuma que nunca se esqueceram de olhar por mim

À minha madrinha Sola e sua mamãe dona Zuri por todo carinho e atenção

À Luis Felipe de Souza Mello pelas palavras proferidas que me fizeram acreditar que tudo nessa vida é possível

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Uma agressão ao corpo, seja ela de natureza física, biológica ou química, produz efeitos locais, no sítio da lesão e nas suas imediações, bem como respostas gerais, envolvendo o corpo como um todo. Quando a natureza do agente agressor é térmica e este entra em contato com uma porção hipotética do ser vivo, temos a caracterização da queimadura. Com relação a tal evento, existem dois aspectos importantes no que tange as respostas biológicas gerais do corpo. Primeiro, a deficiência de controle homeostático e segundo, a interação entre a ferida e o hospedeiro de ambos os pontos de vista metabólico e circulatório (ARTURSON, 1996).

Tal espécie de lesão ocorre muito freqüentemente no nosso cotidiano e embora a maior parte delas seja decorrente de pequenos acidentes domésticos, um número considerável de pacientes apresenta lesões de tal gravidade que põem em risco as suas vidas, configurando importante causa de mortalidade. A relevância clínica das queimaduras reside principalmente na quebra da continuidade protetora da pele contra infecções que podem evoluir para septicemia, assim como às repercussões sistêmicas e suas possíveis complicações (RAMOS e RIBEIRO, 2002; PALHARES, 2005).

A busca por formas de tratamento adequadas que acelerem o processo cicatricial, ou mesmo que, temporariamente, substituam o elemento cutâneo perdido é refletida pela evolução no campo dos biomateriais. Suas aplicações biomédicas indicam a significância e potencial dos vários polissacarídeos microbianos no desenvolvimento de novas classes de materiais médicos. Em específico a celulose microbiana, sintetizada em abundância pela bactéria *Acetobacter xillinum*, representa uma grande promessa como novo sistema de cicatrização de feridas graças às propriedades peculiares advindas de sua nanoestrutura única (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; CZAJA, *et al* 2006; CZAJA, *et al*, 2007).

No vasto campo de agentes adjuvantes a este processo, desde o início dos anos 70, os recursos luminosos têm sido de forma crescente apontados por inúmeros autores como uma alternativa promissora no que se refere a aceleração do processo cicatricial dos mais diversos tipos de lesão (POURZARANDIAN *et al*, 2005). Dentre tais recursos destaca-se a terapia Laser de baixa potencia também conhecida como fotobiomodulação ou laserterapia, referindo-se esta a mobilização de fótons para modular atividades ou processos biológicos (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2007).

Levando em consideração a escassez de modelos exequíveis que possibilitem o estudo de queimaduras de segundo grau bem como as promessas terapêuticas tanto dos biomateriais, como a membrana de celulose microbiana, quanto dos recursos luminosos como o Laser de baixa potência, o presente estudo se fundamenta na importância do estabelecimento de um modelo reprodutível para o estudo das queimaduras de segundo grau bem como na tentativa de se instituir um protocolo de tratamento eficaz para o tratamento de tais lesões a partir da associação de ambas as modalidades de tratamento mencionadas.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 TECIDO CONJUNTIVO E MATRIZ EXTRACELULAR

Os tecidos conjuntivos caracterizam-se, morfológicamente, por apresentarem tipos celulares diversos imersos em matriz extracelular abundante. A matriz extracelular (MEC) corresponde aos complexos macromoleculares relativamente estáveis, formados por moléculas de diferentes naturezas, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Atualmente a matriz extracelular pode ser subdividida em 3 componentes principais: os componentes estruturais fibrosos fibrilares (colágenos fibrilares e fibras elásticas), os componentes não fibrilares (proteoglicanas e glicoproteínas não colagênicas) e microfibrilas (colágeno tipo

IV, microfibrilas associadas à elastina). Os tecidos pertencentes a este grupo desempenham funções de sustentação, preenchimento, defesa e nutrição. Na defesa do organismo tal tecido contribui por conter células que são capazes de compor uma resposta imune como os macrófagos residentes, linfócitos, mastócitos e plasmócitos. O seu papel na nutrição se deve a sua íntima associação aos vasos sanguíneos que transportam e irrigam os tecidos subjacentes com os nutrientes necessários ao trofismo celular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Os tipos celulares mais freqüentemente encontradas no tecido conjuntivo são: os fibroblastos, células características e predominantes neste tecido, que acumulam as funções de síntese dos elementos da matriz extracelular, compactação das fibras colágenas além da sua degradação; miofibroblastos, que além das funções convencionais de um fibroblasto detêm uma força contrátil muito importante na fase de retração da ferida durante o processo cicatricial; pericitos, células presentes na parede vascular de arteríolas capilares e pequenos vasos, apresentando características semelhantes as dos miofibroblastos e origem ainda desconhecida; adipócitos, células especializadas em armazenar gorduras neutras, são abundantes na pele e no tecido subcutâneo; leiomíócitos, que aparecem no tecido conjuntivo fazendo parte dos vasos e como elementos isolados; e outras células, menos numerosas, como macrófagos e mastócitos (ANDRADE, 1999).

Os mastócitos são elementos normais da população celular do tecido conjuntivo fibrilar. Localizam-se primariamente em superfícies cutâneas e em mucosas, próximos a vasos sanguíneos, linfáticos e filetes nervosos. São observados também na medula óssea de indivíduos saudáveis, quase sempre em contato com as traves ósseas (DUARTE *et al*, 1999).

No seu citoplasma, os mastocitos, armazenam mediadores químicos pré-formados incluindo aminas vasoativas ou biogênicas como a histamina presente nos mastocitos humanos e a serotonina presente ao lado da histamina em mastocitos de roedores, enzimas, como as proteases neutras (quimase e triptase) e hidrolases ácidas diversas, proteoglicanos (heparina e

sulfato de codroitina) e fatores quimiotáticos (ECF e NCF) (ABBAS, 2005; JANEWAY *et al* , 2006).

Frente a uma ativação gerada por uma agressão, por exemplo, os mastócitos, inicialmente, respondem liberando seus grânulos contendo os mediadores pré-formados. Além desta reação inicial, os mastócitos podem ser estimulados a produzir outros elementos que incluem os mediadores lipídicos (metabolitos do ácido aracdonico e PAF), metabolizados e armazenados em organelas especiais denominadas de corpos lipídicos, citocinas (como TNF, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6) e quimiocinas como MIP- α e MIP- β (ABBAS, 2005).

Dentre os componentes da matriz extracelular característica dos tecidos conjuntivos dois componentes fibrilares destacam-se, as fibras elásticas e colágenas, desempenhando funções peculiares e de suma importância para a homeostasia dos tecidos que os contêm.

A elastina no organismo humano forma complexos que originam as fibras elásticas das quais é o principal componente. Suas propriedades conferem a tais estruturas a elasticidade característica (MECHAM, 2008).

A análise ultraestrutural das fibras elásticas revela uma conformação estrutural dupla composta por um manto periférico microfibrilar amorfo e um núcleo polimérico insolúvel formado pela elastina. A quantidade de microfibrilas durante o desenvolvimento fetal é superior a de elastina nessas fibras, mas a medida que o embrião evolui esta taxa se inverte rapidamente sendo a concentração de elastina na vida adulta bastante superior a de microfibrilas (MECHAM, 2008). De acordo com o tipo tecidual e perfil funcional destes, os agrupamentos de fibras elásticas diferem quanto a sua disposição e morfologia. Na pele e ligamentos elásticos, as fibras elásticas são menores, dispendo-se em arranjo cordonal e com comprimentos variáveis, nas artérias maiores dispõem-se em lamelas ou folhetos concêntricos enquanto na cartilagem elástica exibem padrão entrelaçado que lembra favos de mel (MECHAM e HEUSER, 1991).

Embora tenham sido inicialmente reconhecidas pelo padrão de absorção de corantes seletivos, tal especificidade é duvidosa sendo os mecanismos que levam a pigmentação muito pouco compreendidos. De acordo com os conceitos atuais as fibras elásticas apresentam estrutura heterogênea com dois componentes visíveis e distintos: um componente amorfo referente a proteína de ligações cruzadas elastina e um componente microfibrilar, que quimicamente difere da elastina e do colágeno, denominado de fibrilina (SMITH Jr, 1967).

O desenvolvimento das fibras elásticas seguem duas etapas: primeiro os agregados longitudinais de fibrilina aparecem e estes subseqüentemente são impregnados pelo componente amorfo, a elastina. Como conseqüência da ordem cronológica que contempla a elastogênese ao longo do tempo, o componente amorfo tende a aumentar enquanto o conteúdo glicoprotéico é reduzido, discretamente (BRADAMANTE e SVAJER, 1977; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). As ligações cruzadas ou *crosslinks* que determinam o padrão final insolúvel das fibras elásticas se dá pela atividade da lysil oxidase sobre aquelas (CAIN, *et al*, 2008).

As fibras elásticas e colágenas são estruturas formadas primariamente pelas proteínas fibrosas elastina e colágeno, respectivamente (SMITH Jr, 1967). As fibras elásticas parecem delgadas delicadas e livremente agrupadas estando invariavelmente associadas as fibras colágenas com orientação perpendicular as mesmas. A trama delimitada por estas fibras apresenta-se mais delicada e sutil na derme superficial ou papilar enquanto nas porções mais profundas ou na derme reticular as fibras que compõem esta arquitetura apresentam-se mais calibrosas e evidentes (MECHAM e HEUSER, 1991).

As fibras colágenas são formadas por uma escleroproteína denominada de colágeno que tem composição peculiar de aminoácidos sendo notável entre eles a quantidade de hidroxiprolina cuja mensuração pode determinar a quantidade de colágeno contida em um dado tecido (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; KADLER, HILL, CANTY-LAIRD, 2008). O colágeno é a proteína estrutural mais comum no corpo humano, representando cerca de

30% do conteúdo protéico total. São conhecidos cerca de 27 tipos diferentes dessa proteína codificados por 41 genes dispersos em ao menos 14 cromossomos. Apresenta fibras birrefringentes constituídas por moléculas alongadas e paralelas. Os colágenos intersticiais ou fibrilares dos tipos I, II, III, V e XI são os mais abundantes. Dentre os colágenos não fibrilares, o colágeno do tipo IV é o mais relevante sendo o principal componente da membrana basal (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar as fibras colágenas sendo eles os fibroblastos, osteoblastos, condrócitos e leiomicócitos. De forma simplificada a síntese do colágeno se dá a partir do procolágeno, molécula precursora derivada do pré-procolágeno. A partir da hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina três cadeias de procolágeno alinham-se em fase havendo em seqüência o arranjo em tripla hélice característico. O procolágeno secretado sofre clivagens por proteases específicas formando as unidades básicas das fibrilas colágenas. Oxidações dos resíduos de lisina e hidroxilisina pela lisil oxidase possibilitam a ocorrência das ligações cruzadas contribuintes para a força tensil detida pelas fibras colágenas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

1.1.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIO E CICATRICIAL

O processo inflamatório é uma resposta complexa a vários agentes nocivos como microorganismos ou agressões das mais diversas naturezas, consistindo de reações vasculares e sistêmicas, migração e ativação de leucócitos. A principal característica do processo inflamatório é a reação dos vasos sanguíneos que leva ao acúmulo de fluido e leucócitos nos tecidos extravasculares (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005)

A atribuição do caráter agudo ou crônico ao processo inflamatório diz respeito à disposição temporal do mesmo e a qualificação das células envolvidas no processo. A denominação aguda refere-se à resposta rápida a uma agressão que tem como função o aporte de células e mediadores inflamatórios. As alterações vasculares que levam ao aumento do fluxo

sanguíneo, a migração e transmigração de neutrófilos, principais células envolvidas na inflamação aguda e a predominância dos fenômenos exudativos caracterizam essa faceta do processo. A inflamação crônica é considerada uma resposta longa onde a destruição tissular e o reparo dos danos se dão de forma concomitante. Ocorrem, no local, fenômenos produtivos, ou seja, de proliferação de vasos e fibroblastos (com conseqüente síntese de colágeno), como também migração e proliferação local de monócitos e linfócitos (MONTENEGRO e FECCHIO, 1999; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A resposta inflamatória está intimamente relacionada ao processo cicatricial, diluindo, destruindo ou isolando o agente agressor e desencadeando uma série de eventos que buscam a reabilitação do tecido danificado. O reparo se inicia nos momentos iniciais do processo inflamatório e vai se intensificando à medida que o agente agressor é neutralizado e eliminado, sendo o microambiente preparado para a regeneração ou a fibrose cicatricial (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O processo de reparo é uma resposta fisiológica normal e geralmente objetiva a restituição da estrutura normal e função tecidual (regeneração). Em determinadas desordens tal processo pode levar a alterações na estrutura tecidual, com morte de células perenes e grandes perdas tissulares, que levam ao desenvolvimento de cicatrização por fibrose (MAURER *et al*, 2003 *apud* VASHEGHANI *et al*, 2007).

Assim, duas formas distintas podem caracterizar o processo cicatricial: a regeneração em que há restituição estrutural e funcional do tecido perdido e a fibroplasia em que o tecido perdido pode ter a sua funcionalidade, em parte privada, em virtude da substituição deste por tecido fibrótico (BALBINO; PEREIRA; CURTI *et al*, 2005).

O processo cicatricial pode ser didaticamente subdividido em cinco fases distintas e que se sobrepõem temporalmente sendo elas: coagulação, com o objetivo fundamental de tamponar a solução de continuidade produzida pelo trauma e através de seus componentes, como é o caso da fibrina, propiciar o

aporte das células de defesa, fibroblastos e queratinócitos; inflamação, em que há inicialmente a mobilização dos neutrófilos compondo a primeira linha de combate ao agente agressor e em seguida à medida que o processo inflamatório adquire um caráter mais crônico os macrófagos assumem a predominância no microambiente e mais tardiamente os linfócitos se agregam ao processo; proliferação, que contempla a re-epitelização, a fibroplasia e formação de matriz extracelular e a angiogênese e remodelação, fase em que se dá a modificação do conteúdo da matriz extracelular, por exemplo, pela substituição do colágeno do tipo III pelo colágeno do tipo I que confere maior resistência tensil a ferida. No caso das feridas que afetam a derme profunda há ainda, a fase de contração, tendo como característica fundamental a intensa atividade de um peculiar tipo celular denominado de miofibroblasto, ocorrendo redução considerável da área da ferida (MANDELBAUM, DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003 (a)).

1.1.3 QUEIMADURAS

Entende-se por queimadura o quadro resultante da ação direta ou indireta do calor sobre o organismo humano, especialmente na pele. Lesões de tal natureza ainda configuram importante causa de mortalidade (SHERIDAN *et al.*, 2000) e considerável morbidade pelo desenvolvimento de sequelas, estando entre as mais graves a incapacidade funcional, especialmente quando atinge órgãos como as mãos e os os traumas psicossociais (BARACHINI *et al.*, 2004; BARILLO e PAULSEN, 2003).

Os países em desenvolvimento possuem uma incidência altíssima de queimaduras, o que transforma tal tipo de acidente numa séria questão de saúde pública. Na Índia, cuja população excede 1 bilhão de habitantes, são estimados cerca de 700.000 a 800.000 queimados por ano (AHUJA; BHATTACHARYA, 2004). Não fugindo a regra dos países menos desenvolvidos, países como os EUA registram cerca de 2 milhões de queimados todos os anos (SUBER *et al.*, 2007; VASHEGHANI, 2007) enquanto no Reino Unido, anualmente, cerca de 250 000 pessoas são afetadas por

queimaduras (BENSON; DICKSON; BOYCE, 2007). A diferença flagrante entre os índices registrados em países como a Índia e os números captados nos Estados Unidos, por exemplo, pode em parte se dever a deficiência, no que tange ao acesso a serviços médico hospitalares bem como ao registro exato do número real de queimados nestes países. Os homens com idade média de 35 anos de idade são os mais afetados em países ocidentais como o Brasil em contraste com a preferência pelas mulheres entre 16 e 35 anos em países do Oriente Médio (VALE, 2005; AHUJA; BHATTACHARYA, 2004).

Dentre as principais fontes de calor envolvidas em acidentes com queimaduras estão às chamas produzidas por combustão do álcool etílico, querosene, entre outros (principal causa entre os adultos no ambiente de trabalho) (VALE, 2005; AHUJA; BHATTACHARYA, 2004) e os líquidos aquecidos como água fervente e óleos (principal causa entre as crianças em ambiente doméstico) (VALE, 2005; DORNELAS, 2008). Outros exemplos de agentes térmicos são os fogos de artifício, muito tradicionais nas festas juninas, principalmente no norte nordeste do Brasil, que nesta época do ano costumam aumentar sensivelmente a incidência deste tipo de acidente (DORNELAS, 2008).

A Sociedade Brasileira de Queimaduras atesta que ocorrem todos os anos cerca de um milhão de casos de queimaduras, sendo que destes cerca de 400.000 culminam em atendimento emergencial e 200.000 necessitam de internamento (DORNELAS, 2008). Dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde no ano 2000 na rede mundial de computadores sinalizam uma média de 2172 atendimentos a queimados pelo SUS ao mês.

Levando em consideração referenciais diversos, muitas classificações tem sido propostas para as queimaduras. Na vasta literatura disponível, duas delas chamam a atenção pela constância das citações. A primeira delas, adotada pelo Ministério da Saúde, aloca as queimaduras em três níveis: primeiro grau, com extensão superficial em geral em nível epidérmico; segundo grau, com comprometimento derme papilar e reticular superficial, caracterizando clinicamente pela presença de bolhas; e terceiro grau que afeta

derme profunda e tecidos subjacentes (VALE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). O segundo sistema de classificação que vigora na Austrália atualmente, subdivide as queimaduras em: epidérmicas, dérmicas superficiais, dérmicas medianas, dérmicas profundas e profundas ou "full thickness", comprometendo hipoderme e regiões subjacentes (KAVANAGH e JONG, 2004).

A diferença entre uma queimadura de segundo grau, onde a perda tecidual não se estende as projeções teciduais mais profundas dos folículos pilosos e uma queimadura de segundo grau profunda, onde a perda tecidual se estende além dos apêndices cutâneos, clinicamente, é crucial. Uma queimadura de segundo grau profunda pode se comportar como uma queimadura "full thickness" ou de terceiro grau, necessitando de enxertos e havendo ainda assim formação de cicatrizes (SUBER, 2007). Uma queimadura de segundo grau superficial, por sua vez cicatriza, usualmente, sem formação de cicatrizes havendo regeneração epitelial a partir das células mais imaturas, que circundam os folículos pilosos (SUBER, 2007; FUCHS, 2007).

Na superfície corpórea do ser humano a epiderme da pele e seus apêndices compõem uma barreira protetora à entrada de microorganismos e impedem perda dos fluidos essenciais a homeostase corpórea (FUCHS, 2007). A queimadura compromete exatamente essa função primordial da pele, responsável pela homeostase hidroeletrólítica, controle da temperatura interna, flexibilidade e lubrificação da superfície corporal. A magnitude do comprometimento dessas funções depende da extensão e profundidade da queimadura (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001; JOSE et al., 2004).

Em 1947, Jackson observou as modificações dinâmicas no período pós queimaduras, delimitando 3 zonas distintas que se referem a: zona de coagulação que entra em contato direto com a fonte de calor havendo perda tecidual irreversível, devido necrose de coagulação dos constituintes proteicos; zona de estase que circunda a zona de coagulação caracterizando-se por redução da perfusão sanguínea, passível de recuperação se instituído o correto protocolo de tratamento; zona de hiperemia que apresenta fluxo sanguíneo

aumentado representando a frente de defesa a agressão (WATTS *et al*, 2001; HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; MAHAJAN *et al*, 2006).

As modificações fisiopatológicas da queimadura são caracterizadas pelos efeitos causados pelo calor por si só e, sobreposto a isso, há o estabelecimento de um pronunciado processo inflamatório agudo. Um aumento repentino da temperatura da superfície corporea resulta em respostas locais imediatas pelos vasos sanguíneos na área com o objetivo de dissipar o calor por vasodilatação. Uma grande elevação da temperatura tecidual leva a uma reação inflamatória com liberação de mediadores inflamatórios e uma série de reações em cascata acabam por ser disparadas (ARTUNSON, 1996; VALE, 2005).

As respostas inflamatórias a agressão, infecção e a própria resposta imune modulada com superprodução de mediadores químicos, ativação de leucócitos e células endoteliais e uma alteração das citocinas circulantes, devem contribuir para os efeitos sistêmicos (ARTUNSON, 1996; MACEDO, *et al*, 2003). Assim, em pacientes com queimaduras graves esses efeitos são: susceptibilidade aumentada a infecção, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome do estresse respiratório do adulto e síndrome da disfunção múltipla de órgãos que pode dar origem a falência múltipla dos órgãos e morte (ARTUNSON, 1996; BARBER *et al*, 2006).

1.1.4 LASERTERAPIA

O emprego da luz como fator indutor ou estimulador de processos biológicos vitais transcende o tempos modernos sendo primeiramente descrito pelos indianos, gregos e romanos que já se utilizavam da helioterapia, que consiste da exposição a luz solar para a cura de processos patológicos.

A luz vermelha inicialmente utilizada por Finsen, o pai da fototerapia contemporânea, foi descrita no século XIX por tal pesquisador como uma alternativa no que se refere ao tratamento de distúrbios fisiológicos. No século

seguinte, no ano de 1917 foi publicada sob o título alemão “Zur Quantum Theory”, a teoria que deu origem ao conceito de Laser (acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”) (BRUGNERA e PINHEIRO, 1998; BAGNATO, 2001; GENOVESE, 2003; GENOVESE, 2008). O primeiro Laser, que tinha como meio ativo o Rubi, foi descrito em 1960 por Maiman emitindo luz vermelha coerente.

A soma dos princípios físicos do Laser com o conhecimento prévio da eficácia da energia luminosa, em especial do espectro vermelho, norteiam a aplicabilidade clínica deste recurso através da laserterapia, que consiste do emprego de luz Laser de baixa potência para a modulação dos processos e sistemas biológicos (REDDY, 2004; AL WATBAN e DELGADO, 2005; ROCHA Jr. *et al*, 2007).

Os Lasers de baixa intensidade são aparelhos que emitem radiações de baixa intensidade, sem potencial destrutivo e que atuam sem provocar aquecimento expressivo (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2005). Neste grupo enquadram-se atualmente o Laser Hélio-Neônio e os Lasers Semicondutores denominados também como Lasers diodo. Entende-se por semi-condutor, substâncias não isolantes que possuem condutividade inferior a dos metais. Os Lasers diodo, foco do presente estudo, emitem radiação obtida a partir da estimulação de um diodo semicondutor formado por cristais de arseneto de gálio (AsGa), arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) e fosfeto de índio gálio e alumínio (InGaAlP) (GENOVESE, 2008).

No organismo humano o citocromo *c* oxidase ou complexo IV da cadeia respiratória é apontado como principal aceptor da energia fotônica do Laser. Levando em consideração a absorção da energia e transformação da mesma em um potencial de ação, quatro mecanismos são sugeridos para tal: modificação das propriedades redox dos componentes da cadeia respiratória, geração de oxigênio nascente, aquecimento dos cromóforos e aumento da produção do ânion superóxido levando a subsequente aumento da concentração do produto de sua dismutação, o peróxido e hidrogênio (KARU *et al*, 1999; PAL *et al*, 2007).

Em linhas gerais, a energia Laser quando aplicada nos tecidos causa reações de natureza fisiológica. No organismo, a interação do Laser de baixa intensidade constitui a incorporação da energia contida na luz Laser pelos tecidos irradiados. As conseqüências dessas interações são: 1) efeitos primários subdivididos em bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos; 2) efeitos secundários que estimulam a microcirculação e trofismo celular; 3) efeitos terapêuticos, efeitos analgésicos, anti-edema e cicatrizantes (GENOVESE, 2008).

De forma sistemática as respostas geradas nos sistemas biológicos também podem ser enquadradas no grupo dos efeitos diretos, (respostas imediatas ao estímulo, como alterações da membrana plasmática) e indiretos (respostas mediatas ao estímulo ocorridas após as primeiras 24h como a síntese de proteínas). Muitos estudos comprovaram o aumento da atividade do complexo multiproteico IV da cadeia respiratória após a irradiação com Laser vermelho sugerindo-se que este seja o fotoceptor primário dos fótons na célula (SILVEIRA *et al*, 2006; KARU, 1999, KARU, 1989). Outro elementos que parecem ser mobilizados pela estimulação com luz laser incluem a bomba Na/K ATPase, que participa do balanço iônico intracelular (SANTOS *et al*, 2007), atividade pro-mitótica (ROCHA *et al*, 2007), potencial para indução da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (SCHNEIDER *et al*, 1990), aumento da taxa de degranulação de mastócitos teciduais (VASHEGHANI, 2008).

Especificamente, no processo de reparo existem duas hipóteses que se referem a atividade do Laser de baixa potencia sobre este processo. A primeira delas preconiza que a luz Laser é capaz de induzir o desenvolvimento de um processo inflamatório discreto que promove um "*up-regulation*" da angiogênese em torno da ferida e a segunda delas propõe que a laserterapia previne a exacerbação do processo inflamatório com aumento da síntese de colágeno, havendo convergência de ambas para o alcance da aceleração do processo cicatricial (YASUKAWA *et al*, 2007).

1.1.5 CELULOSE MICROBIANA

A celulose microbiana é um biopolímero produzido por grupos específicos de bactérias sendo, quimicamente, idêntica a celulose vegetal, porém, ultraestruturalmente, apresentando-se de forma bastante distinta. Sua estrutura tridimensional consiste de uma rede ultrafina de nanofibrilas de 3 a 8 nm de comprimento (cerca de 100 vezes menores que as fibras da celulose vegetal) que são, uniaxialmente, orientadas, características que lhe conferem alta cristalinidade, enorme força mecânica e uma superfície que lhe propicia retenção de grande quantidade de água (em torno de 200 vezes o seu peso seco) (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; CZAJA *et al*, 2007).

Vários gêneros bacterianos agregam a capacidade de sintetizar a celulose sendo exemplos: *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Achromabacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium* e *Sarcina*. Dentre os grupos citados destaca-se o gênero *Acetobacter* como o mais, detalhadamente, estudado e pelo seu produto microfibrilar celulósico, metabolicamente, inerte e com altíssimo grau de pureza (ROSS *et al*, 1991).

A síntese da celulose pelo gênero *Acetobacter* de bactérias é um processo complexo que envolve a polimerização de resíduos únicos de glicose, formados a partir dos compostos de carbono presentes no meio nutricional, em cadeias lineares de β -1,4 glucan, que em seguida são secretadas no meio extracelular através de poros situados em sua membrana externa, formando sub-fibrilas contendo entre 10 a 15 cadeia lineares que mais tarde se reunirão em microfibrilas e finalmente em feixes de microfibrilas compostas por cerca de 1000 cadeias lineares individuais (CZAJA *et al*, 2006; CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004).

Os primeiros esforços para a comercialização em larga escala da celulose microbiana foram expendidos pela Johnson & Johnson's no início dos anos 80, com pesquisas dizendo respeito a ação de desta sobre diferentes tipos de feridas. Embora tenha sido pioneira, tal companhia não levou adiante

seus projetos para comercialização do produto, provavelmente em virtude de dificuldades no que tange ao desenvolvimento de um sistema de fermentação em larga escala. Uma segunda companhia desta vez de nacionalidade brasileira, a Biofill produtos biotecnológicos, criou uma linha de produtos compostos pela celulose microbiana que incluem o Biofill[®] atual Nexfill[®] e o Bioprocess[®] (utilizados no tratamento de queimaduras, úlceras e como substitutos temporários de pele) e o Gengiflex[®] (aplicado no tratamento de alterações periodontais). Posteriormente, diversas outras entidades investiram nesta tecnologia como um grupo formado pelo governo Japonês e mais seis grandes companhias integrando o Biopolymer Research Co. (anos 90), o governo polonês (anos 90), a companhia americana Xylos Co. (1996), que negociou com a Johnson & Johnson's o uso exclusivo da patente da sua família XCell[®] de produtos para o tratamento de feridas, alcançando o reconhecimento pelo FDA, seguida das também americanas Cetus Co., Weyerhaeuser Co. e Kelco, Inc. (CZAJA *et al*, 2006).

A celulose microbiana resguarda as seguintes propriedades: nanoestrutura única, pureza completa (ausência de lignina e hemicelulose), totalmente biodegradável, estabilidade dimensional, baixo peso molecular, alta durabilidade, alta capacidade de reter água, porosidade seletiva, alta resistência quando umedecida (SHAH e BROWN, 2005; BROWN, 1989) e baixo custo (MANDELBAUM, DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003 (b)). Sua aplicabilidade se estende as indústrias alimentícia, produtos de áudio, cuidados a saúde, automotivas, cuidados com bebês, minas e petróleo, cosmética e beleza, têxtil e calçados, dentre outras (BROWN, 1989).

Devido as suas propriedades peculiares a celulose microbiana tem demonstrado ser um curativo para feridas altamente eficaz, detendo funções que incluem: adequação aos contornos da ferida, alto grau de aderência aos componentes da matriz extracelular como por exemplo a fibrina e fibronectina, manutenção da umidade do microambiente da ferida que garante a formação de um tecido de granulação de qualidade com redução da formação de cicatrizes e aceleração da reepitelização, guiando os queratinócitos que irão compor a epiderme (CZAJA *et al*, 2007; MAYALL *et al*, 1990).

1.1.6 APLICABILIDADE DO LASER E DA CELULOSE MICROBIANA SOBRE QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU

Representando um problema de saúde pública pela freqüência com que acontecem, as queimaduras despertaram o interesse de fábricas multinacionais e pesquisadores para desenvolvimento de tecnologias que aliviem ou minimizem o sofrimento e os danos trazidos aos pacientes.

Alguns estudos experimentais contemplando a atividade do Laser de baixa potência sobre queimaduras de segundo e terceiro grau foram publicados nos últimos anos. Os estudos de Schlager *et al* (2000) e Bayat *et al* (2006) que utilizaram modelos animais para o estudo da atividade dos laser vermelho de baixa intensidade, He-Ne, sobre o reparo de queimaduras de segundo e terceiro grau não demonstram diferenças entre os grupos tratados e não tratados.

Com relação à membrana de celulose microbiana, desde 1989 o grupo de Dr. Ivo Pitanguy bem como outros autores como Peixoto e Santos (1988), já utilizavam com sucesso a membrana de celulose microbiana tanto em queimaduras como em áreas doadoras de enxerto, verificando sensível melhora e evolução acelerada no quadro clínico dos pacientes. A eficácia da membrana é atribuída as suas propriedades peculiares que permitem a manutenção do trofismo tecidual, a facilidade de manipulação, redução do número de curativos, transparência que permite o exame da ferida sem remoção do curativo dentre outras.

Na literatura não há relatos até o presente momento da associação do Laser à membrana de celulose microbiana para o tratamento de queimaduras de segundo grau o que enfatiza a importância de pesquisas como esta, que visam o estabelecimento de um modelo experimental para o estudo de tais queimaduras e que permitam a análise deste protocolo de tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

-Estudar o processo de reparo de queimaduras de segundo grau tratadas com a membrana de celulose (NEXFILL®) associadas ao Laser AlGaInP 660nm a partir da análise morfológica em ratos *wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Estabelecer as bases para um modelo experimental visando o estudo do processo reparativo de queimaduras de segundo grau em ratos *wistar*

-Fazer uma análise morfológica seqüencial e comparativa do processo de reparo em ratos submetidos a queimaduras de segundo grau e tratadas com curativos de celulose microbiana e Laser AlGaInP 660nm através do exame histológico em HE.

-Estudar o processo de fibrose através da coloração especial do Picrosírius nos vários grupos experimentais

-Estudar nos grupos experimentais o padrão morfológico das fibras elásticas através do método da Orceína

-Verificar a influência do uso da membrana de celulose microbiana e ou Laser AlGaInP 660nm no processo reparativo de queimaduras de segundo grau

-Quantificação dos mastócitos através da coloração azul de toluidina a 0,1%, nos vários grupos experimentais a sua relação com o tratamento e reparo das queimaduras de segundo grau

3. CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado mediante aprovação do Comitê de Experimentação e Uso Animal (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo FIOCRUZ-Bahia, com número de protocolo 008/2007. Foram seguidos os princípios éticos da experimentação animal, bem como a prática didático-científica da vivisseccção destes – Lei 6.638/79 (GOLDIM, 1995).

3.2 DELINEAMENTO

Este foi um estudo do tipo experimental, morfológico, descritivo, comparativo e seqüencial.

3.3 ANIMAIS

Foram selecionados 64 ratos albinos da raça *Rattus norvegicus*, classe Mammalia, ordem Roedentia, linhagem *Wistar*, machos, jovens, sadios, com idade de, aproximadamente, dois meses e peso entre 150 e 200 gramas, cada um deles proveniente do Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram randomicamente alocados nos seguintes grupos:

1) GRUPO CONTROLE (IRRADIAÇÃO SIMULADA “SHAM IRRADIATION”)

Tabela 1: Descrição do grupo Controle, submetido apenas a queimadura de segundo grau (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo Controle (não tratados)	Tempo de sacrifício	Número de animais
C – 24h	24h	4
C – 3	3 dias	4
C – 7	7 dias	4
C – 14	14 dias	4

2) GRUPO I (TRATADO COM LASER)

Tabela 2: Descrição do grupo I, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com Laser de baixa intensidade 660nm, 40mW/ 20J/cm² (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo Laser 660nm	Tempo de sacrifício	Número de animais
GI – 24h	24h	4
GI -3	3 dias	4
GI -7	7 dias	4
GI -14	14 dias	4

3) GRUPO II (TRATADO APENAS COM A MEMBRANA)

Tabela 3: Descrição do grupo II, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com membrana celulose microbiana (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo Membrana	Tempo de sacrifício	Número de animais
GII – 24h	24h	4
G II-3	3 dias	4
GII -7	7 dias	4
GII-14	14 dias	4

4) GRUPOS III (TRATADO COM O LASER E MEMBRANA)

Tabela 4: Descrição do grupo III, submetido a queimadura de segundo grau e tratado com Laser de baixa intensidade 660nm 40mW/ 20J/cm² associado a membrana de celulose microbiana (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo Laser + membrana	Tempo de sacrifício	Número de animais
G III – 24h	24h	4
G III-3	3 dias	4
G III -7	7 dias	4
G III-14	14 dias	4

3.4 ESPAÇO FÍSICO PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os procedimentos cirúrgicos e a manutenção dos animais ocorreram no Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fiocruz-Bahia. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, forradas com maravalha, que foram substituídas ciclicamente. A dieta foi livre e padronizada (Labina[®]) e a água *ad libitum*. Os animais foram mantidos a temperatura média de 22°C, ciclo claro/ escuro de 12h e condições normais de umidade.

3.5 ENSAIO PILOTO

Foram realizados cinco ensaios piloto durante a fase de padronização da metodologia. O primeiro deles envolveu mensurações laboratoriais referentes ao aparelho preconizado por Meyer e Silva, 1999, para a indução da queimadura, que consiste de um cubo de latão com as mensurações de 2 x 2 x 2 cm fundido a uma chave de fenda sem ponta ativa como representado na figura 1 utilizado para indução da lesão quadrada de 4cm². Para a mensuração laboratorial da temperatura em que este cubo entrava em contato com o dorso do animal foi confeccionado, no mesmo, um orifício para encaixe da base de um termômetro de mercúrio. O tempo de imersão do instrumento em água fervente de um minuto do instrumento foi definido como ideal já que tempos superiores exibiram estabilidade no que se refere a elevação da temperatura da ponta ativa do instrumento. Através destes ensaios identificamos uma temperatura inicial de 92°C e que se manteve ao fim dos cinco décimos de segundo, apesar da conhecida perda de calor, o termômetro de mercúrio não foi capaz de registrar nenhuma alteração

Através de ensaios seriados para padronização da lesão (queimadura de segundo grau) foram induzidas lesões com os tempos de exposição de 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 e 20 segundos mensurados em cronômetro digital com sensibilidade para mensuração até a marca dos centésimos de segundo. Após

a análise microscópica, foi escolhida a lesão tecidual induzida com 0,5 segundos, por ser esta compatível com os requisitos exigidos para a aplicação da membrana (lesão limitada a porção mais superficial da derme reticular sem comprometimento dos anexos cutâneos - queimadura de segundo grau).

3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (Ketalar®) e xilazina (Rompum®). Uma solução resultante da mistura de uma dose de 75mg/Kg de cloridrato de quetamina em proporção de 1:1 com uma dose de xilazina 10mg/Kg foi aplicada em seringa única nos animais.

Após a fase anestésica foi realizada a tricotomia manual (remoção dos pelos com as extremidades dos dedos seguindo o sentido contrário do crescimento destes) da região média do dorso dos animais, sendo em seguida executada a antissepsia com Iodo Polivinilpirrolidona. Para a simulação da queimadura foi reproduzida a técnica inicialmente descrita por Meyer e Silva (1999), e utilizado o instrumento já descrito anteriormente. Este objeto teve sua ponta ativa aquecida pela imersão da mesma em um recipiente contendo água fervente, a uma temperatura de 100°C, por um minuto quando então foi posto em contato com o dorso do animal, sem pressão adicional, sendo assim mantido por cinco décimos de segundo aferidos em cronômetro digital por um segundo operador. Como o intervalo de tempo utilizado para queimadura foi muito curto e por isso muito difícil de ser mensurado, estabeleceu-se a pronúncia da palavra “mil” (coincidente com esta fração de segundos) e a execução desta etapa experimental por apenas um operador, como forma prática de padronizar as lesões. Logo após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam uma dose de dipirona sódica líquida por via oral, ajustada de acordo com o peso dos mesmos.

3.7 CURATIVO COM A MEMBRANA CELULOSE MICROBIANA

Logo após a indução da queimadura foi efetuada a remoção da epiderme superficial comprometida através de abrasão delicada executada com auxílio de lâmina de bisturi número 15 para exposição do tecido subcutâneo trófico. Tal procedimento, denominado tecnicamente de debridamento, e efetuado com auxílio de tesouras ou bisturis é padrão no tratamento clínico de pacientes com queimaduras de segundo grau de acordo com Kavanagh e Jong, 2004 e Hudspith e Hayatt, 2004. Isso foi feito para que os componentes expostos da matriz extracelular deste tecido pudessem entrar em contato com os nano poros membrana de celulose microbiana havendo assim adesão entre os mesmos. Após o preparo do leito da ferida, fragmentos de 2,5 x 2,5 cm, da membrana, foram aplicados sobre a mesma com auxílio de pinça clínica e gaze, estéreis.

3.8 LASERTERAPIA

3.8.1 CÁLCULO DA DENSIDADE DE ENERGIA (DE)

De acordo com a maioria dos artigos publicados que contemplam a análise da laserterapia optou-se, no presente estudo, pela aplicação do conceito de densidade de energia, que corresponde ao montante energético que incide sobre uma determinada área, como referência para o protocolo de irradiação (PINHEIRO e BRUGNERA 2008; GENOVESE, 2008).

$$DE = \frac{\int}{A}, \text{ onde } \int = P \times t$$

DE: Densidade de energia

Legendas:

\int : Trabalho, P: Potência, t: Tempo, A: Área

O aparelho utilizado no presente estudo, o Twin Laser (MM Optics/São Carlos-SP), emite radiação considerando a quantidade de energia emitida

sobre uma área de 4mm^2 referente a área circular do feixe de radiação emanado pelo aparelho. Na vasta literatura existente sobre a radiação Laser, a área adotada para a irradiação corresponde na maioria das vezes a 1cm^2 e desta forma foram necessários alguns ajustes para a conversão da DE oferecida pelo aparelho. Como a área proposta pelo estudo, de 4cm^2 , é maior que a utilizada para o cálculo automático do aparelho, mantendo-se a DE final de $5\text{J}/\text{cm}^2$, adotamos a potência de 40mW ($0,04\text{W}$) substituindo a variável P e a área de 1cm^2 substituindo a variável A, com objetivo de encontrar o tempo (t) necessário para que 1cm^2 receba-se 5J de energia. O tempo encontrado foi de $125''$ ou $2' 5''$ que contrastam com os 10s oferecidos pelo aparelho que toma como referência a área $0,04\text{cm}^2$.

3.8.2. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO

Preconizou-se no presente estudo que os animais alocados nos grupos GI e GIII fossem irradiados com caneta que emite luz dentro da faixa de comprimentos de onda que compõem a cor vermelha utilizando como meio ativo o fosfeto de índio gálio e alumínio (AlGaInP) e com os seguintes parâmetros λ 660nm com dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$, 40mW , $\varnothing = 4\text{mm}$, $t=125\text{s}$. Todos os grupos tiveram a mesma rotina de aplicação do Laser, de forma que os mesmos foram irradiados imediatamente após a indução da queimadura seguida de uma irradiação a cada 48 horas até um dia antes do sacrifício conforme a disposição do grupo em 24h, 3, 7 e 14 dias. As feridas foram irradiadas de forma pontual em quatro pontos que coincidiam com os vértices da ferida sendo aplicado em cada ponto uma densidade de energia de $5\text{J}/\text{cm}^2$ totalizando $20\text{J}/\text{cm}^2$. A determinação desta quantidade de energia baseou-se em estudos publicados que utilizaram estes parâmetros produzindo efeitos positivos sobre o processo cicatricial (PINHEIRO *et al*, 2004; MEIRELLES, 2005; MEIRELLES *et al*, 2008 (a e b)). O grupo controle recebeu durante o período experimental de acordo com o momento de sacrifício pré-estabelecido a simulação de uma irradiação com a caneta desligada durante um intervalo de tempo idêntico àquele calculado automaticamente para os grupos tratados com Laser.

3.9 SACRIFICIO E COLETA DAS AMOSTRAS

De acordo com os pontos de tempo pré-determinados na alocação dos animais em seus respectivos grupos estes foram sacrificados individualmente por asfixia em câmara de CO₂, que tinha a transmissão de gás ligada 40 segundos antes da inserção dos animais. Após a constatação da ausência de sinais vitais, os animais foram levados a mesa cirúrgica para remoção das amostras de tecido. Para melhor visualização da lesão preconizou-se excisão cirúrgica, realizada com auxílio de lâmina de bisturi, com margem de segurança de 5 mm além dos limites da lesão e profundidade de cerca de 3 mm. Uma vez removidos, os espécimes eram seccionados, também com auxílio de lâmina de bisturi, em duas porções de tamanhos equivalentes que receberam tratamentos distintos de acordo com a técnica de estudo aplicada.

3.9.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICA

As porções de tecido destinadas a histoquímica para as colorações HE, Picrosírius e orceína foram afixadas distendidas em placas de isopor com auxílio de alfinetes para evitar o dobramento do tecido e acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados contendo formalina tamponada a 10%, onde permaneceram por no mínimo 12 horas para fixação tecidual. A outra porção tecidual foi criopreservada.

3.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o período de fixação, os espécimes de tecido foram clivados e processados de acordo com a rotina para inclusão em parafina. Os blocos submetidos à inclusão foram identificados e submetidos à microtomia com 4µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (H/E), Picrosírius para estudo da fibrose, Orceína para o estudo das fibras

elásticas e Azul de toluidina a 0,1% para análise morfométrica dos mastócitos. A análise histológica foi realizada em microscópio óptico ZEISS AXIOSCOP.

3.11 ANÁLISE CEGA DAS AMOSTRAS

Para a manutenção do sigilo durante a análise cega do estudo, os grupos foram codificados atribuindo-se randomicamente letras a cada um dos grupos e mantendo-se após a letra a numeração referente ao tempo de sacrifício e a cada animal experimental (Tabela 5). O material foi analisado por dois patologistas sem que eles soubessem a que grupos pertenciam as amostras.

Tabela 5: Codificação das amostras para análise dos resultados (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo	Código	Exemplo
Controle	W	Grupo I, Animal 1, tempo de 24 h – W 24.1
G I	B	Grupo I, Animal 1, tempo de 24 h – B 24.1
G II	X	Grupo II, Animal 1, tempo de 24 h – X 24.1
G III	H	Grupo III, Animal 1, tempo de 24 h – H 24.1

Nota: O examinador desconhecia a identificação dos grupos durante a avaliação

3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA - PROTOCOLO

Para a análise histomorfológica do material estabeleceram-se oito tópicos de avaliação: alterações de natureza inflamatória (natureza e graduação do infiltrado inflamatório e graduação do edema); alterações das bordas epiteliais (degeneração hidrópica, espongirose, exocitose e acantose); crosta fibrinoneutrófila; regeneração epitelial; fibrose; fibras elásticas; presença de adipócitos na derme reticular.

Para a análise das alterações de natureza inflamatória subdividiu-se a avaliação em três tópicos. O primeiro deles referiu-se a natureza do infiltrado inflamatório, definida como ausente, predominantemente polimorfonuclear, predominantemente mononuclear ou mista. O segundo tópico avaliado foi a graduação do infiltrado em ausente (0), discreto (+), moderado (++) e intenso (+++) e o terceiro a ausência ou presença de edema intersticial com sua graduação idêntica àquela aplicada ao infiltrado inflamatório, se a sua presença fosse confirmada.

As alterações das bordas epiteliais já mencionadas anteriormente também foram graduadas de acordo com escala também citada no parágrafo anterior. Regeneração epitelial e crosta fibrinoneutrófila foram analisadas definindo-se a ausência ou presença parcial (quando apenas parte da superfície da ferida estava coberta por crosta) ou total (quando toda a superfície da ferida estava coberta por crosta) nas amostras.

A verificação da fibrose e da presença de adipócitos na derme reticular, foi efetuada também atribuindo-se os escores ausente (0), discreto (+), moderado (++) e intenso (+++) enquanto as fibras elásticas foram avaliadas quanto ao grau de redução/aumento com os mesmos escores utilizados para a análise da fibrose. A ficha de avaliação utilizada pelos examinadores segue em anexo.

3.13 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS MASTOCITOS NA LESÃO

Para tal análise, secções histológicas da lesão foram coradas com azul de toluidina a 0,1% e as lâminas obtidas, estudadas, morfometricamente, ao microscópio de luz, com aumento de 400x. Para este fim foram selecionados, aleatoriamente, 8 a 10 campos, de áreas representativas da lesão, onde estas células foram então manualmente contadas. A partir dos números obtidos foram calculadas as médias aritméticas de cada espécime para que fossem realizadas as análises qualitativas e estatísticas.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

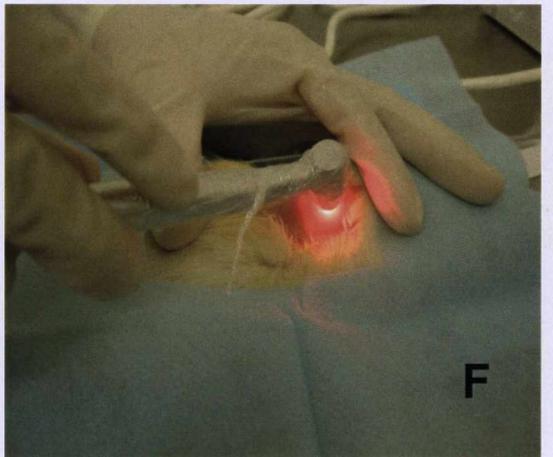
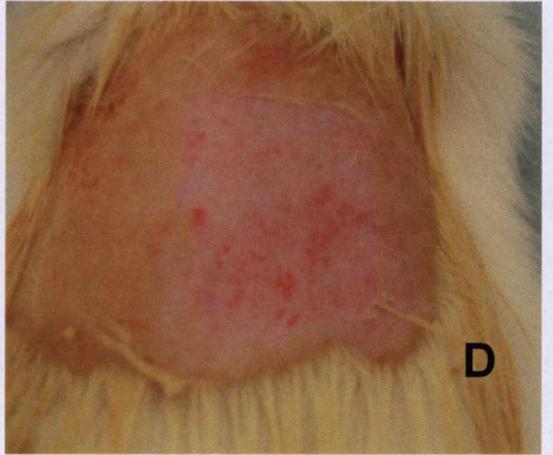
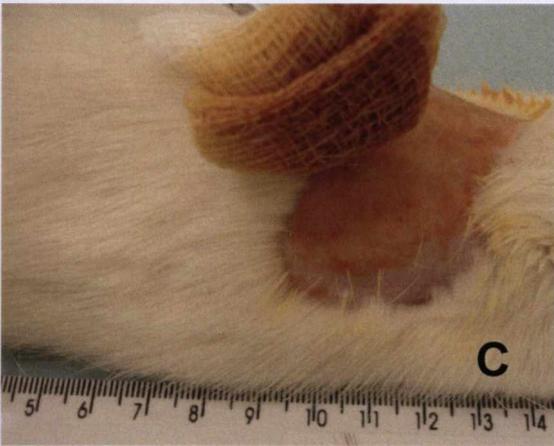
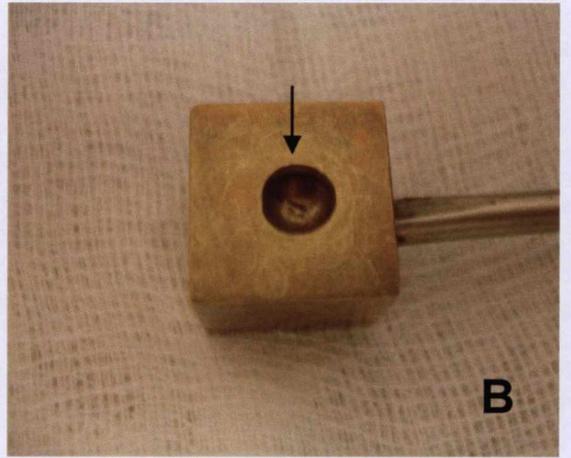
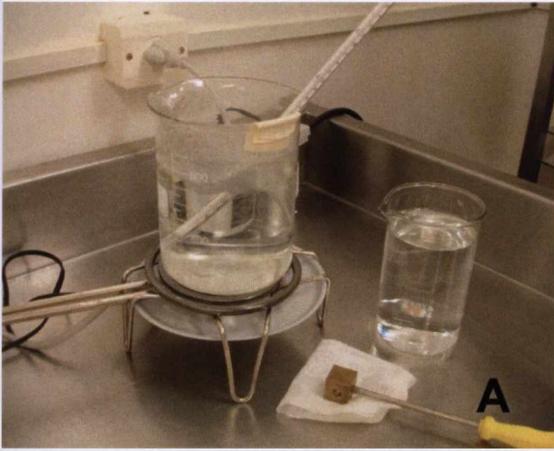
Para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados três testes não paramétricos contidos no Software BioEstat 4.0 (adotando como significativo os valores de p menores que 0,05), o teste exato de Fisher e o teste de Kolmogorov-Smirnov, aplicáveis a dados qualitativos e amostras reduzidas como é o caso do presente estudo e o teste de Mann Whitney aplicável a amostras reduzidas com dados numéricos, em específico para a análise morfométrica dos mastócitos.

Para a análise das alterações de natureza inflamatória, fibrose, fibras elásticas e avaliação da presença de adipócitos na derme reticular, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em virtude do tamanho reduzido dos subgrupos (n=4), para que fosse possível a aplicação do teste referido, a comparação entre os grupos foi realizada em todos os tempos experimentais, simultaneamente, ou seja, todas as observações dos quatro subgrupos de cada grupo foram somadas totalizando um número de 16 espécimes, e assim os grupos como um todo foram confrontados.

A avaliação dos itens: crosta fibrino-neutrofilica, regeneração epitelial e das alterações das bordas epiteliais sofreu simplificação da sua representação para presença ou ausência de forma que, por subgrupo temporal, fosse aplicada a análise binomial do teste exato de Fisher.

O tratamento estatístico dos dados morfométricos dos mastócitos presentes no sítio da lesão foi procedida aplicando-se o teste não-paramétrico para duas amostras independentes de Mann Whitney.

Figura 1- A: Equipamento utilizado para indução da queimadura (termômetro, aquecedor, aparelho para indução da queimadura); B: Ponta ativa cuboidal do instrumento utilizado para a indução da queimadura de segundo grau (seta indicando orifício adaptado para encaixe do termômetro de mercúrio; aferida foi executada com a face lisa da ponta ativa); C: Assepsia pré-cirúrgica do dorso tricotomizado com solução de PVPI (Iodo Polivinilpirrolidona); D: Lesão após microabrasão com bisturi; E: Aparelho Twin Laser MM Optics/São Carlos-SP e óculos de proteção; F: Irradiação com o Twin Laser $\lambda 660\text{nm}$ 40mW/ 20J/cm²



4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

4.1.1 ALTERAÇÕES CUTÂNEAS DE NATUREZA INFLAMATÓRIA

Para melhor detalhamento das alterações inflamatórias e levando em consideração a importância da preservação da maior extensão possível da derme reticular para a fidedignidade da queimadura de segundo grau, subdividimos o estudo do tecido conjuntivo da pele em três zonas: Derme papilar ou superficial, situada logo abaixo da epiderme, derme reticular ou profunda e hipoderme. Tais zonas foram avaliadas quanto a presença ou ausência e natureza do infiltrado inflamatório e de edema.

4.1.1.1 DERME PAPILAR

Passadas as primeiras 24 horas, todos os 16 animais distribuídos nos quatro grupos experimentais apresentaram infiltrado inflamatório agudo predominantemente polimorfonuclear. Nos grupos controle, I (Laser) e II (Membrana) a graduação do infiltrado inflamatório foi predominantemente intensa, com 100% (n=4), 75% (n=3) e 75% (n=3), respectivamente. O grupo III (Laser e Membrana) não seguiu a tendência dos demais grupos exibindo infiltrado moderado em três dos seus quatro exemplares. O edema esteve presente em todos os grupos com graduações variáveis, porém nos grupos Controle e II (Membrana) tal alteração esteve presente em 50% (n=2) dos espécimes enquanto nos grupos I (Laser) e III (Laser e Membrana) em 75% (n=3) (Tabela 6).

Após três dias, as células inflamatórias presentes no leito da ferida continuaram sendo características de um processo agudo nos grupos controle (75%, n=3), II (Membrana) (75%, n=3) e III (Laser e Membrana) (75%, n=3). Diferente dos demais, o grupo I (Laser) apresentou infiltrado inflamatório misto (50%, n=2) e polimorfonuclear (50%, n=2). A graduação dessas células foi em todos os grupos discreta: Controle, I (Laser) e II (Membrana) (100%, n=4) e III (Laser e Membrana) (75%, n=3). O edema intersticial esteve presente de forma discreta em 100% dos grupos I (Laser) e II (Membrana) e ausente nos grupos controle (100%, n=4) e III (Laser e Membrana) (75%, n=3) (Tabela 7).

Passados sete dias, a natureza do infiltrado inflamatório foi bastante heterogênea, sendo, mais freqüentemente, mista nos grupos controle (50%, n=2), II (Membrana) (50%, n=2) e III (Laser e Membrana) (50%, n=2) e em todo o grupo I (Laser). A graduação do infiltrado oscilou entre discreto e ausente nos grupos controle e II (Membrana), com 50%(n=2), cada, e discreta na maioria dos espécimes dos grupos I (Laser) (100%, n=4) e III (Membrana) (75%, n=3). O edema esteve presente de forma intensa em 100% do grupo I (Laser) e de forma discreta em 50%, (n=2) dos grupos controle e II enquanto ausente no grupo III (Laser e Membrana) (Tabela 6).

Seguidos 14 dias, o infiltrado inflamatório foi qualificado como crônico ou misto nos animais sacrificados. Apenas um animal do grupo I (Laser) e o grupo II (Membrana) exibiram ausência do infiltrado inflamatório neste momento. Quanto ao grau, o infiltrado inflamatório foi discreto em 100% (n=4) dos grupos controle e II (Membrana) e em 75% (n=3) do grupo I (Laser). O tecido conjuntivo esteve, discretamente, edemaciado nos grupos controle (100%, n=4), I (Laser) (75%, n=3) e III (Laser e Membrana) (100%, n=4) e não edemaciado no grupo II (Membrana) (Tabela 6).

Tabela 6: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na **derme papilar** durante período experimental (Salvador/Bahia, 2009)

<i>Grupo</i>	<i>Natureza do infiltrado inflamatório</i>	<i>% (n)</i>	<i>Graduação do infiltrado inflamatório</i>	<i>% (n)</i>	<i>Edema</i>	<i>% (n)</i>
Controle (24h)	Agudo	100 (4)	Moderado	25 (1)	Discreto	25 (1)
			Intenso	75 (3)	Moderado	50 (2)
Controle (3d)	Agudo	75 (3)	Discreto	100 (4)	Ausente	100 (4)
Controle (7d)	Ausente	50 (2)	Ausente	50 (2)	Ausente	50 (2)
			Crônico	50 (2)	Discreto	50 (2)
Controle (14d)	Crônico	100 (4)	Discreto	100 (4)	Discreto	100 (4)
Grupo I (24h)	Agudo	100 (4)	Intenso	100 (4)	Moderado	100 (4)
Grupo I (3d)	Crônico	25 (1)	Discreto	100 (4)	Discreto	100 (4)
Grupo I (7d)	Crônico	100 (4)	Discreto	100 (4)	Intenso	100 (4)
Grupo I (14d)	Ausente	25 (1)	Ausente	25 (1)	Ausente	25 (1)
			Crônico	75 (3)	Discreto	75 (3)
Grupo II (24h)	Agudo	100 (4)	Discreto	25 (1)	Ausente	25 (1)
			Intenso	75 (3)	Discreta	25 (1)
					Moderado	50 (2)
Grupo II (3d)	Agudo	75 (3)	Discreto	100 (4)	Discreto	100 (4)
Grupo II (7d)	Ausente	50 (2)	Ausente	50 (2)	Ausente	50 (2)
			Misto	50 (2)	Discreto	50 (2)
Grupo II (14d)	Ausente	50 (2)	Ausente	100 (4)	Ausente	25 (1)
					Misto	50 (2)
Grupo III (24h)	Agudo	100 (4)	Moderado	75 (3)	Ausente	25 (1)
			Intenso	25 (1)	Discreta	75 (3)
			Discreto	100 (4)	Ausente	75 (3)
Grupo III (3d)	Agudo	50 (2)	Discreto	100 (4)	Ausente	75 (3)
					Misto	50 (2)
Grupo III (7d)	Ausente	25 (1)	Ausente	25 (1)	Ausente	100 (4)
			Agudo	25 (1)	Discreto	75 (3)
Grupo III (14d)	Misto	50 (2)	Discreto	100 (4)	Ausente	100 (4)

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

4.1.1.2 DERME RETICULAR

Vinte e quatro horas após a indução da queimadura houve uma predominância das células inflamatórias características de um processo agudo em todos os animais dos grupos controle, I (Laser) e II (Membrana) (n=4) e em três exemplares do grupo III (Laser e Membrana). O infiltrado inflamatório apresentou grau moderado em todos os exemplares dos grupos controle, discreto em dois animais do grupo II (Membrana) e ausente em 75% (n=3) do grupo III (Membrana). O tecido apresentou-se edemaciado de forma discreta

em 50% dos grupos controle e II (Membrana), moderada no grupo I (Laser) (100%, n=4) e ausente no grupo III (Laser e membrana) (75%, n=3) (Tabela 7).

Após três dias, foi observado um infiltrado inflamatório agudo no sítio da lesão em 50%(n=2) dos grupos controle, I (Laser) e II (Membrana) sendo este ausente em 75%(n=3) do grupo III (Laser e Membrana). A quantidade de células inflamatórias foi graduada como discreta em 50% (n=2) dos grupos controle e II (Membrana) e em todos os quatro espécimes do grupo I (Laser) e estiveram ausentes em 75% grupo III (Laser e Membrana). O edema esteve ausente em todos os grupos (Tabela 7).

Após sete dias, o infiltrado inflamatório esteve ausente em todos os espécimes dos grupos controle, II (Membrana) e III (Laser e Membrana) e foi crônico nos quatro exemplares do grupo I (Laser), dos quais dois apresentaram graduação discreta e os outros dois restantes graduação moderada. O edema foi observado, em grau moderado, apenas no grupo I (Laser) (75%, n=3) (Tabela 7).

Passados 14 dias, as células inflamatórias estiveram ausentes em 75% (n=3) dos grupos controle e II (Membrana), em todo o grupo I (Laser) e em 50% (n=2) do grupo III (Laser e Membrana) em que os outros 50% (n=2) apresentavam infiltrado crônico discreto. O edema não foi verificado em nenhum

em 50% dos grupos controle e II (Membrana), moderada no grupo I (Laser) (100%, n=4) e ausente no grupo III (Laser e membrana) (75%, n=3) (Tabela 7).

Após três dias, foi observado um infiltrado inflamatório agudo no sítio da lesão em 50%(n=2) dos grupos controle, I (Laser) e II (Membrana) sendo este ausente em 75%(n=3) do grupo III (Laser e Membrana). A quantidade de células inflamatórias foi graduada como discreta em 50% (n=2) dos grupos controle e II (Membrana) e em todos os quatro espécimes do grupo I (Laser) e estiveram ausentes em 75% grupo III (Laser e Membrana). O edema esteve ausente em todos os grupos (Tabela 7).

Após sete dias, o infiltrado inflamatório esteve ausente em todos os espécimes dos grupos controle, II (Membrana) e III (Laser e Membrana) e foi crônico nos quatro exemplares do grupo I (Laser), dos quais dois apresentaram graduação discreta e os outros dois restantes graduação moderada. O edema foi observado, em grau moderado, apenas no grupo I (Laser) (75%, n=3) (Tabela 7).

Passados 14 dias, as células inflamatórias estiveram ausentes em 75% (n=3) dos grupos controle e II (Membrana), em todo o grupo I (Laser) e em 50% (n=2) do grupo III (Laser e Membrana) em que os outros 50% (n=2) apresentavam infiltrado crônico discreto. O edema não foi verificado em nenhum dos grupos neste momento (Tabela 7).

Tabela 7: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na derme reticular durante período experimental (Salvador/Bahia, 2009)

Grupo	Natureza do infiltrado inflamatório	% (n)	Graduação do infiltrado inflamatório	% (n)	Edema	% (n)
Controle (24h)	Agudo	100 (4)	Moderado	100 (4)	Ausente Discreto Moderado	25 (1) 50 (2) 25 (1)
Controle (3d)	Ausente	50 (2)	Ausente	50 (2)	Ausente	100 (4)
Controle (7d)	Agudo	50 (2)	Discreto	50 (2)	Ausente	100 (4)
Controle (14d)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)
Grupo I (24h)	Ausente	75 (3)	Ausente	75 (3)	Ausente	100(4)
Grupo I (3d)	Crônico	25 (1)	Discreto	25 (1)	Ausente	100 (4)
Grupo I (7d)	Agudo	100 (4)	Moderado	100 (4)	Moderado	100 (4)
Grupo I (14d)	Agudo	50 (2)	Discreto	100 (4)	Ausente	100 (4)
Grupo II (24h)	Crônico	25 (1)	Moderado	50 (2)	Moderado	75 (3)
Grupo II (3d)	Misto	25 (1)	Ausente	50 (2)	Intenso	25 (1)
Grupo II (7d)	Crônico	100 (4)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)
Grupo II (14d)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)
Grupo III (24h)	Agudo	100 (4)	Ausente	50 (2)	Ausente	25 (1)
Grupo III (3d)	Agudo	75 (3)	Discreto	50 (2)	Discreto	50 (2)
Grupo III (7d)	Agudo	25 (1)	Discreto	25 (1)	Moderado	25 (1)
Grupo III (14d)	Crônico	25 (1)	Ausente	75 (3)	Ausente	100(4)
Grupo III (24h)	Ausente	25 (1)	Ausente	75 (3)	Ausente	25 (1)
Grupo III (3d)	Agudo	75 (3)	Discreto	25 (1)	Discreto	75 (3)
Grupo III (7d)	Ausente	25 (1)	Ausente	75 (3)	Ausente	100 (4)
Grupo III (14d)	Agudo	75 (3)	Discreto	25 (1)	Ausente	100 (4)
Grupo III (24h)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)	Ausente	100 (4)
Grupo III (3d)	Agudo	25 (1)	Ausente	75 (3)	Ausente	100 (4)
Grupo III (7d)	Agudo	75 (3)	Discreto	25 (1)	Ausente	100 (4)
Grupo III (14d)	Crônico	25 (1)	Ausente	75 (3)	Ausente	100 (4)
Grupo III (24h)	Crônico	50 (2)	Discreto	50 (2)	Ausente	100 (4)

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

4.1.1.3 HIPODERME

Assim como ocorrido nas dermes papilar e reticular, a hipoderme apresentou nas primeiras 24h uma predominância de células inflamatórias polimorfonucleares caracterizando um processo agudo, havendo apenas um espécime do grupo III (Laser e Membrana) que apresentou ausência de células inflamatórias, neste momento. O infiltrado inflamatório apresentou graduação discreta em 75% (n=3) dos animais do grupo controle, 100% (n=4) do grupo I

(Laser) e 50%(n=2) dos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana). O edema foi verificado em 25% (n=1) dos exemplares dos grupos controle e III (Laser e Membrana) e em todo o grupo I, em grau discreto (Laser) (Tabela 8).

Passados três dias, o infiltrado inflamatório observado nessa camada foi de natureza mista em 75% (n=3) dos grupos controle, II (Membrana) e III (Laser e Membrana) e esteve ausente em dois dos quatro animais do grupo I (Laser). A graduação deste infiltrado apresentou-se discreta em 75% (n=3) dos grupos controle e II (Membrana), moderada no grupo III (Laser e Membrana) e ausente no grupo I (Laser). Esta região apresentou ausência de edema em 50% (n=2) do grupo controle e 100% (n=4) do grupo I (Laser), entretanto 50% (n=2) do grupo II (Membrana) exibiram edema em grau discreto e 50% (n=2) do grupo III (Laser e Membrana) em grau moderado (Tabela 8).

Com sete dias nenhuma célula inflamatória foi observada nos grupos controle, II (Membrana) e III (Laser e Membrana). Somente o grupo I (Laser) exibiu infiltrado inflamatório crônico em todos os seus espécimes exibindo três deles grau discreto e um deles grau moderado. O edema foi verificado apenas nos grupos controle, em um único espécime, e no grupo I (Laser), em três exemplares (Tabela 8).

No décimo quarto, dia havia infiltrado crônico discreto em apenas um animal dos grupos controle e II (Membrana). O edema não foi verificado em nenhum dos grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Representação percentual da graduação do infiltrado inflamatório e edema na hipoderme durante período experimental (Salvador/Bahia, 2009)

<i>Grupo</i>	<i>Natureza da Inflamação</i>	<i>% (n)</i>	<i>Graduação da inflamação</i>	<i>% (n)</i>	<i>Edema</i>	<i>% (n)</i>
Controle (24h)	Agudo	100(4)	Ausente Discreto	25(1) 75(3)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)
Controle (3d)	Ausente Misto	25(1) 75(3)	Ausente Discreto	25(1) 75(3)	Ausente Discreto	50(2) 50(2)
Controle (7d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)
Controle (14d)	Ausente Crônico	75(3) 25(1)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)	Ausente	100(4)
Grupo I (24h)	Agudo	100(4)	Discreto	100(4)	Discreto	100(4)
Grupo I (3d)	Ausente Crônico Misto	50(2) 25(1) 25(1)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)	Ausente	100(4)
Grupo I (7d)	Crônico	100(4)	Discreto Moderado	75(3) 25(1)	Discreto Moderado	75(3) 25(1)
Grupo I (14d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
Grupo II (24h)	Agudo	100(4)	Ausente Discreto	50(2) 50(2)	Ausente	100(4)
Grupo II (3d)	Ausente Misto	25(1) 75(3)	Ausente Discreto	25(1) 75(3)	Ausente Discreto	50(2) 50(2)
Grupo II (7d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
Grupo II (14d)	Ausente Crônico	75(1) 25(1)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)	Ausente	100(4)
Grupo III (24h)	Agudo Ausente	75(3) 25(1)	Ausente Discreto Moderado	25(1) 50(2) 25(1)	Ausente Discreto	75(3) 25(1)
Grupo III (3d)	Ausente Misto	25(1) 75(3)	Ausente Moderado	25(1) 75(3)	Ausente Discreto Moderado	25(1) 25(1) 50(2)
Grupo III (7d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
Grupo III (14d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

4.1.2 ALTERAÇÕES DAS BORDAS EPITELIAIS

Seguidas as primeiras 24 horas, a hiperplasia epitelial, em especial da camada espinhosa, denominada de acantose, esteve ausente em todos os grupos analisados. A degeneração hidrópica ou edema intracelular, esteve presente somente nos grupos I (Laser) e II (Membrana) de forma discreta em 75% (n=3) dos seus espécimes. O edema intersticial ou espongirose, foi encontrado somente nos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana) nos quais os percentuais alcançaram, respectivamente, 25% (n=1) e 75% (n=3). As células inflamatórias permearam o epitélio (exocitose) em grau discreto em 100% (n=4) do grupo controle e 25% (n=1) do grupo II (Membrana), em grau intenso no grupo III (Laser e Membrana) (75%, n=3) e esteve ausente no grupo I (Laser) (Tabela 9).

Após três dias, a acantose esteve discretamente presente em todos os exemplares dos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana) e de forma moderada em 100% (n=4) e 50% (n=2) dos grupos controle e I (Laser), respectivamente. Em todos os grupos analisados, a degeneração hidrópica, afetou de forma moderada a metade dos espécimes dos grupos I (Laser) e III (Laser e Membrana) e 75% (n=3) do grupo controle e de forma discreta em 50% (n=2) do grupo II (Membrana). A espongirose apresentou-se discreta em 75% (n=3) do grupo controle e esteve ausente nos grupos I (Laser) (100%, n=3), II (Membrana) (100%, n=4) e III (Laser e Membrana) (75%, n=3). Houve exocitose em apenas dois dos quatro espécimes do grupo III (Laser e Membrana), em grau discreto, sendo os demais exemplares isentos de tal alteração (Tabela 9).

Passados sete dias acantose foi, predominantemente, moderada nos grupos controle (50%, n=2), I (Laser) (75%, n=3) e II (Membrana) (75%, n=3), não sendo visualizada no grupo III (Laser e Membrana). Somente o grupo I (Laser) com 25% (n=1) dos seus espécimes apresentou discreta degeneração hidrópica. A espongirose esteve ausente em todos os grupos. Houve exocitose discreta em apenas dois dos quatro espécimes do grupo III (Laser e Membrana) sendo os demais exemplares isentos de tal alteração (Tabela 11).

Ao final dos 14 dias, foi verificada em 4 e 2 espécimes dos grupos Controle e III (Laser e Membrana), respectivamente, ausência de acantose enquanto nos grupos I e II houve uma alternância entre os graus discreto (50%, n=2) e moderado (50%, n=2). Neste momento degeneração hidrópica, esponjose e exocitose não foram mais identificadas nos grupos experimentais (Tabela 9).

Tabela 9: Representação em percentuais das alterações das bordas epiteliais durante período experimental (Salvador/Bahia, 2009)

<i>Grupo</i>	<i>Acantose</i>	<i>% (n)</i>	<i>Degeneração Hidrópica</i>	<i>% (n)</i>	<i>Esponjose</i>	<i>% (n)</i>	<i>Exocitose</i>	<i>% (n)</i>
Controle (24h)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Discreta	100(4)
Controle (3d)	Moderada	100(4)	Discreta	25(1)	Ausente	25(1)	Ausente	100(4)
			Moderada	75(3)	Discreta	75(3)		
Controle (7d)	Discreta	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	50(2)						
Controle (14d)	Ausente	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Discreta	25(1)						
	Moderada	25(1)						
Grupo I (24h)	Ausente	100(4)	Ausente	25(1)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
			Discreta	75(3)				
Grupo I (3d)	Discreta	50(2)	Discreta	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	50(2)	Moderada	50(2)				
Grupo I (7d)	Discreta	25(1)	Ausente	75(3)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	75(3)	Discreta	25(1)				
Grupo I (14d)	Discreta	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	50(2)						
Grupo II (24h)	Ausente	100(4)	Ausente	25(1)	Ausente	75(3)	Ausente	75(3)
			Discreta	75(3)	Discreta	25(1)	Discreta	25(1)
Grupo II (3d)	Discreta	100(4)	Ausente	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
			Discreta	50(2)				
Grupo II (7d)	Discreta	25(1)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	75(3)						
Grupo II (14d)	Discreta	50(2)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
	Moderada	50(2)						
Grupo III (24h)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	25(1)	Ausente	25(1)
					Discreta	75(3)	Intensa	75(3)
Grupo III (3d)	Discreta	100(4)	Ausente	50(2)	Ausente	75(2)	Ausente	50(2)
			Moderada	50(2)	Discreto	25(1)	Discreta	50(2)
Grupo III (7d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)
Grupo III (14d)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)	Ausente	100(4)

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

4.1.3 CROSTA FIBRINONEUTROFÍLICA

Após as primeiras 24 horas, a crosta fibrinoneutrofílica, advinda da necrose de coagulação proporcionada pelo contato do instrumento indutor com a pele dorsal dos animais, esteve presente em toda superfície da queimadura em todos os grupos. Seguindo a cronologia do estudo, aos três dias, alguns dos animais exibiram tal alteração apenas em parte da ferida correspondendo, em porcentagem, a 50% (n=2) nos grupos I (Laser) e controle, 25% (n=1) no grupo II (Membrana) e 100% (n=4) no grupo III (Laser e Membrana).

Passados sete dias da indução da lesão, 50% (n=2) dos animais do grupo controle apresentaram crosta, parcialmente, representado, e outros 50% (n=2) ausência desta estrutura. Neste mesmo instante, todos os espécimes do grupo I (Laser) e dois do grupo II (Membrana) apresentaram crosta sobre toda a extensão da superfície enquanto 100% (n=4) o grupo III (Laser e Membrana) exibiu crosta apenas parcialmente.

Houve tendência a evolução da presença total e parcial à ausência da crosta entre as primeiras 24h e os 14 dias que se seguiram a indução da lesão, sendo esta tendência mais clara nos grupos controle, I (Laser) e II (Membrana) em que 50% (n=2), 100% (n=4) e 75% (n=3) dos animais, respectivamente, apresentaram ausência de crosta ao final dos 14 dias. O grupo III (Laser e Membrana) apresentou, neste período, crosta parcial em 100% (n=4) dos seus espécimes. Os dados presentes neste tópico encontram-se expostos, detalhadamente, na tabela 10.

Tabela 10: Avaliação da evolução da **crosta fibrinoneutrofílica** em animais submetidos a queimaduras de segundo grau em função do tempo experimental e do tipo de tratamento empregado (Salvador/Bahia, 2009)

GRUPO	Tempo experimental	Crosta fibrinoneutrofílica		
		Presente % (n)		Ausente % (n)
		Parcial	Total	
Controle	24hs	0	100(4)	0
	3dias	50(2)	50(2)	0
	7dias	50(2)	0	50(2)
	14dias	50(2)	0	50(2)
Grupo I	24hs	0	100(4)	0
	3dias	50(2)	50(2)	0
	7dias	0	100(4)	0
	14dias	0	0	100(4)
Grupo II	24hs	0	100(4)	0
	3dias	25(1)	75(3)	0
	7dias	25(1)	50(2)	25(1)
	14dias	0	25(1)	75(3)
Grupo III	24hs	0	100(4)	0
	3dias	100(4)	0	0
	7dias	100(4)	0	0
	14dias	100(4)	0	0

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

4.1.4 REGENERAÇÃO EPITELIAL

A regeneração epitelial começou a ser efetivamente verificada a partir do terceiro dia, apesar de terem sido observados, em raríssimos casos, lingüetas epiteliais, sob a crosta fibrino-neutrofílica, com 24 h, indicando o início do processo. Neste momento todos os espécimes já apresentavam regeneração epitelial de no mínimo 50% da superfície. Após sete dias os grupos controle, II (Membrana) e III (Laser e Membrana) tinham 100% (n=4) dos animais, apresentaram-se com regeneração completa a exceção do grupo I (Laser e Membrana), no qual a conclusão deste evento se deu em 75% (n=3) dos espécimes. No décimo quarto dia todos os grupos já haviam concluído a re-epitelização (Figuras 2 e 3).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

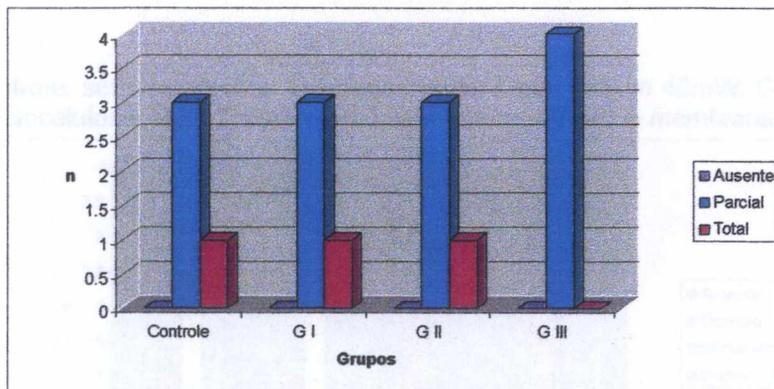


Figura 2: Representação gráfica da regeneração epitelial nos grupos experimentais após 3 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

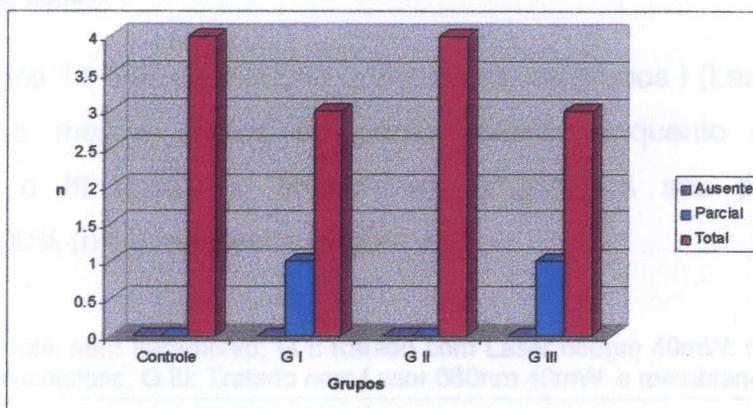


Figura 3: Representação gráfica da regeneração epitelial nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/Bahia, 2009)

4.1.5 FIBRAS COLÁGENAS

Após 24h, nenhuma alteração fibrogênica foi observada nos grupos analisados, como já era esperado. Embora não tenhamos verificado a fibrose, propriamente dita, neste momento um achado comum foi um notável adensamento das fibras colágenas, normalmente presentes traduzido pela coloração mais forte pelo Picrossírius, verificado em 100% (n=4) dos espécimes avaliados. Somente após sete dias, uma fibrose jovem começou a ser efetivamente visualizada, momento em que os grupos I (Laser) e controle exibiam aumento moderado das fibras colágenas em 75% (n=3) dos seus

espécimes, ao passo que, a graduação discreta foi atingida em 50% (n=2) e 100% (n=4) nos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana), respectivamente (Figura 4).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

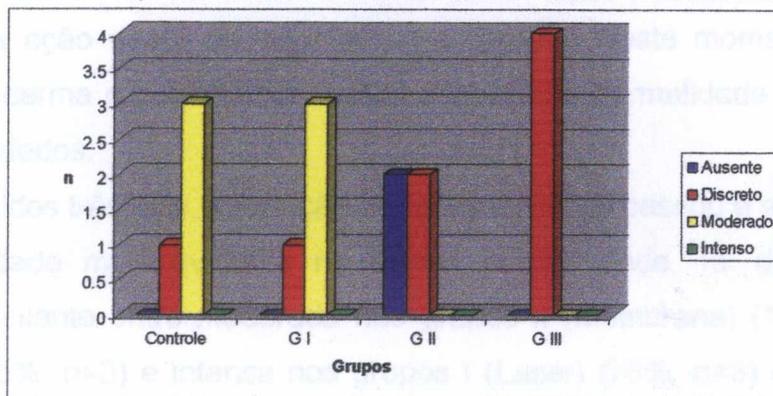


Figura 4: Representação gráfica da fibrose nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Seguidos 14 dias da indução queimadura, os grupos I (Laser) e controle mantiveram o mesmo índice do ponto anterior enquanto os grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana) modificaram seu perfil exibindo graduação 100% (n=4) moderada (Figura 5).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

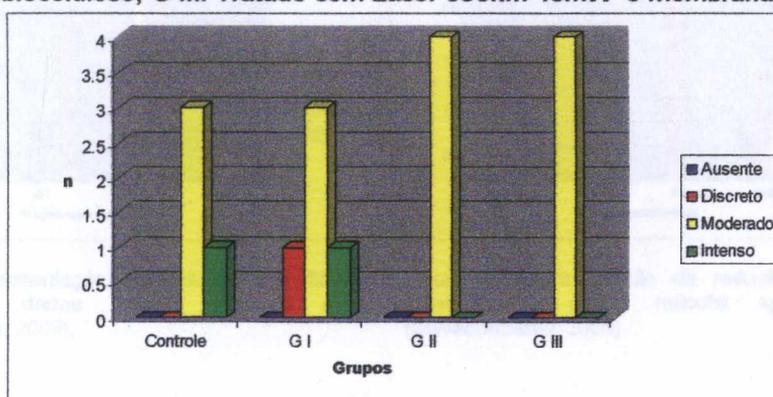


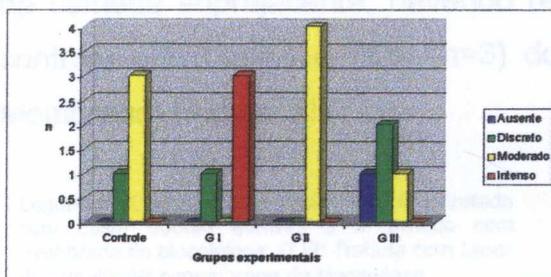
Figura 5: Representação da fibrose nos grupos experimentais após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009).

4.1.6 FIBRAS ELÁSTICAS

Nas primeiras 24 horas a avaliação, particularmente, restringiu-se a derme reticular em virtude da necrose coagulativa esperada na derme papilar gerada pela ação direta do calor sobre a mesma. Neste momento a malha elástica da derme reticular ainda exibia aspecto de normalidade em todos os grupos estudados.

Seguidos três dias, a redução de fibras elásticas passou a ser observada em intensidade mais evidente na derme papilar onde, tal diminuição se manteve oscilante entre moderada nos grupos II (Membrana) (100%, n=3) e Controle (75%, n=3) e intensa nos grupos I (Laser) (75%, n=3) e III (Laser e Membrana) (50%, n=2) (Figura 6). Na derme reticular, redução moderada foi observada em 50% (n=2) dos espécimes no grupo I (Laser) e 75% (n=3) no grupo controle. Não se observou redução intensa das fibras elásticas nos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana) com porcentagem de 100% (n=4) (Figura 7).

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose



Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

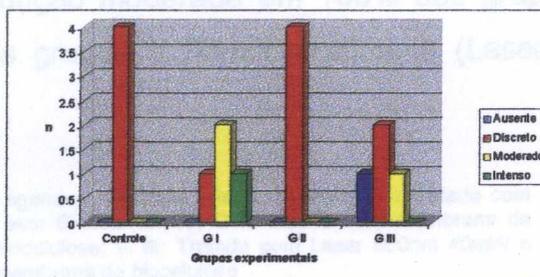


Figura 6: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 3 dias (Salvador/Bahia, 2009).

Figura 7: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 3 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Passados 7 dias a redução foi intensa em 100% (n=4) dos espécimes nos grupos controle e I (Laser) e em 75% (n=3) no grupo II (Membrana). O único grupo a apresentar redução predominantemente discreta foi o III (Laser e Membrana) em 75% (n=3) dos seus integrantes (Figura 8). Na derme reticular as fibras permaneceram intactas de forma unânime nos grupos II (Membrana) e III

(Laser e Membrana) e moderada em 75% (n=3) do controle e 50% (n=2) do grupo tratado apenas com Laser (Figura 9).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

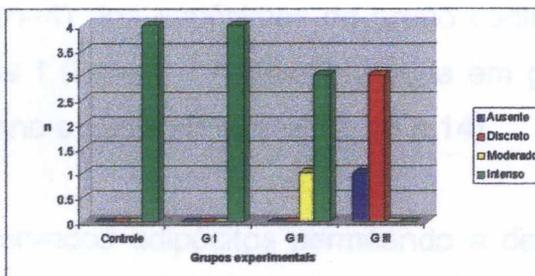
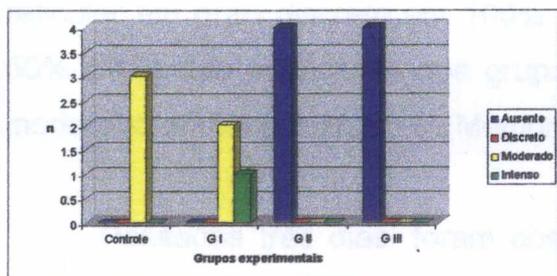


Figura 9: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 7 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Figura 8: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 7 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Seguidos 14 dias a derme papilar apresentava diminuição intensa da trama elástica em 75% (n=3) dos grupos controle e II (Membrana) e 100% (n=4) do grupo I (Laser) e moderada em 75% (n=3) do grupo III (Laser e Membrana) na derme papilar (Figura 10). O quadro evidenciado na derme reticular mais uma vez demonstrou ser menos crítico do que aquele encontrado na camada suprajacente, havendo redução moderada em 100% dos grupos controle e I (Laser) e 75% (n=3) dos grupos II (Membrana) e III (Laser e Membrana) (Figura 11).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

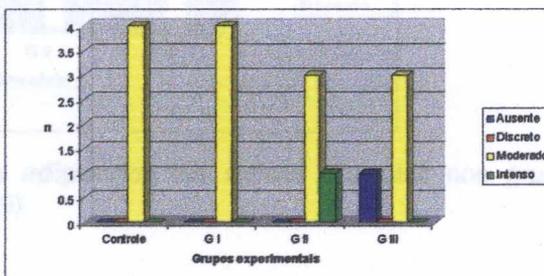
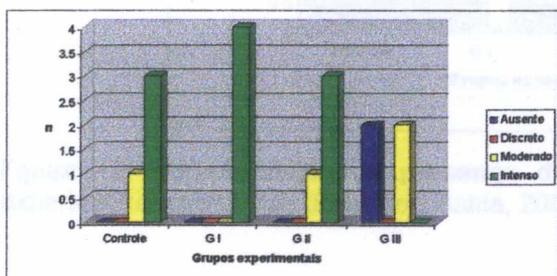


Figura 10: Representação da redução das fibras elásticas na derme papilar após 14 dias (Salvador/Bahia, 2009)

Figura 11: Representação da redução das fibras elásticas na derme reticular após 14 dias (Salvador/Bahia, 2009)

4.1.7 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ADIPÓCITOS NA DERME RETICULAR

Após 24 horas, verificou-se a presença de células adiposas na derme reticular em grau discreto em 100% (n=4) dos espécimes do grupo controle, 50% (n=2) dos espécimes dos grupos I (Laser) e II (Membrana) e em grau moderado em todo o grupo III (Membrana e Laser) (Figuras 12, 13 e 14).

Passados três dias, foram observados adipócitos permeando a derme reticular em grau discreto em 75%(n=3) dos espécimes dos grupos controle e I (Laser) e em 50%(n=2) dos grupos II (Membrana) e III (Membrana e Laser) (Figuras 12, 13 e 14).

Após sete dias, as células adiposas estiveram presentes em grau discreto apenas nos grupos controle (50%, n=2) e II (Membrana) (100%, n=4) (Figuras 12, 13 e 14). Ao final dos 14 dias experimental tal alteração deixou de ser observada em todos os grupos experimentais.

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

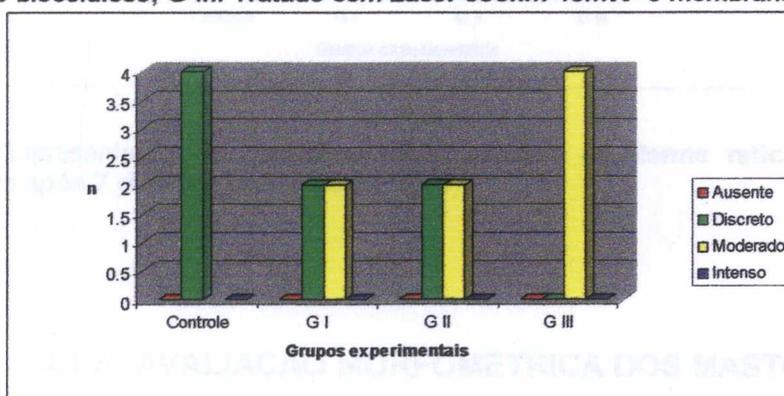


Figura 12: Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 24h (Salvador/ Bahia, 2009)

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

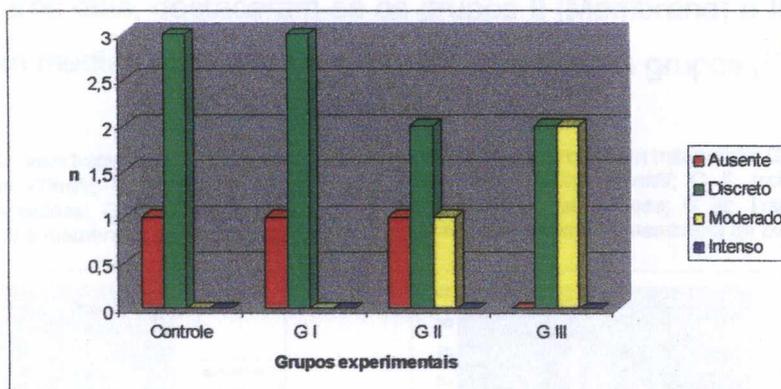


Figura 13: Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

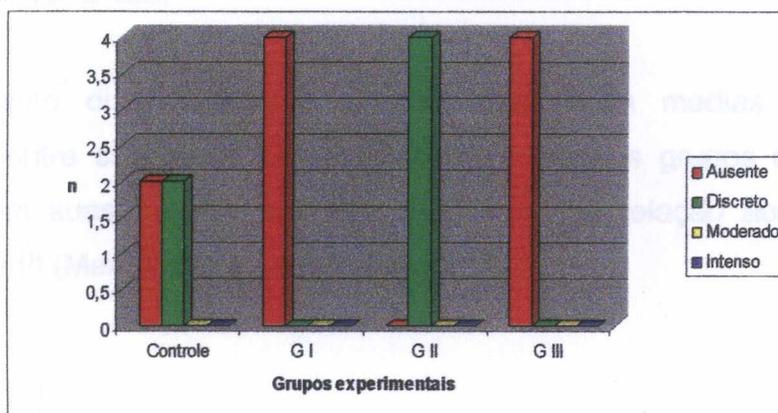


Figura 14: Representação da presença de adipócitos na derme reticular nos grupos experimentais após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)

4.1.8 AVALIAÇÃO MORFOMETRICA DOS MASTOCITOS

Passadas 24 horas, os grupos I (Laser), II (Membrana) e III (Membrana e laser) apresentaram medias moderadamente equilibradas quando comparadas entre si destacando-se apenas o grupo controle com medias

aritméticas, de um modo geral, mais baixas em relação aos outros grupos (Figura 15).

Após três dias, destacaram-se os grupos II (Membrana) e III (Membrana e Laser), com medias mais altas em relação aos demais grupos (Figura 16).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

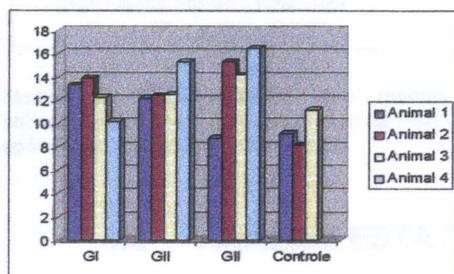


Figura 15: Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 24 horas (Salvador/ Bahia, 2009)

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

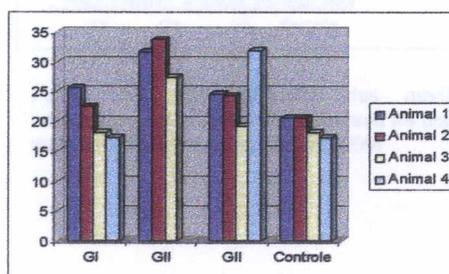


Figura 16: Representação das medias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 3 dias (Salvador/ Bahia, 2009)

Após sete dias, todos os grupos mantiveram medias aritméticas semelhantes entre si (Figura 17). Passados 14 dias os grupos controle e I (Laser) tiveram suas medias bastante reduzidas em relação aos grupos II (Membrana) e III (Membrana e Laser) (Figura 18).

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

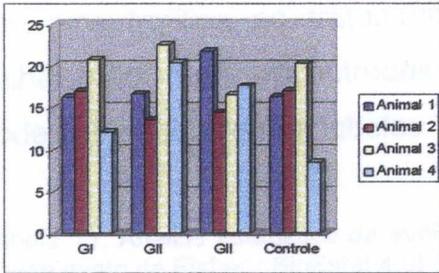


Figura 17: Representação das médias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 7 dias (Salvador/ Bahia, 2009)

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

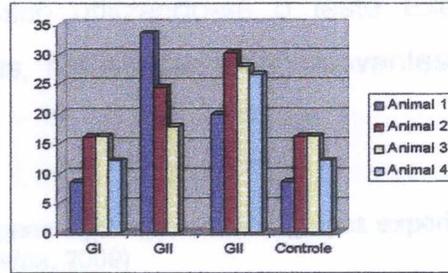


Figura 18: Representação das médias aritméticas dos mastocitos presentes na lesão após 14 dias (Salvador/ Bahia, 2009)

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.2.1 ALTERAÇÕES DE NATUREZA INFLAMATÓRIA

Com relação a qualificação e graduação do infiltrado inflamatório e edema nas dermes papilar e reticular e na hipoderme, comparando-se os grupos experimentais entre si não foram detectadas diferenças significantes quando os dados foram tratados estatisticamente com o teste de proporções de Kolmogorov-Smirnov (Software BioEstat 4.0).

4.2.2 FIBROSE E FIBRAS ELÁSTICAS

Aplicando-se o teste de proporções de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras independentes (Software BioEstat 4.0) aos grupos experimentais, comparando-os entre si, ao longo de todo o período experimental, não foram encontradas diferenças, estatisticamente, significantes no que tange a redução das fibras elásticas em ambas as dermes papilar e reticular, o mesmo acontecendo com a fibrose.

4.2.3 REGENERAÇÃO EPITELIAL E CROSTA FIBRINO-NEUTROFÍLICA

Submetendo os dados referentes a regeneração epitelial e crosta fibrino-neutrofílica ao tratamento estatístico utilizando-se o teste Exato de Fisher, não foram encontradas diferenças, estatisticamente, relevantes como pode ser verificado nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Análise estatística da evolução da regeneração epitelial nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher / BioEstat 4.0) (Salvador/Bahia, 2009)

	3 dias	7 dias	14 dias
Controle x I	p = 0,7857	p = 0,5	p = 1
Controle x II	p = 0,7857	p = 1	p = 0,5
Controle x III	p = 0,5	p = 0,5	p = 1
I x II	p = 0,7857	p = 0,5	p = 0,5
I x III	p = 0,5	p = 0,7857	p = 1
II x III	p = 0,5	p = 0,5	p = 0,5

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose
Nota: No tempo de 24h todos os grupos apresentaram regeneração epitelial ausente
Significância estatística com $p < 0,05$

Tabela 12: Análise estatística da evolução da crosta fibrinoneutrofílica nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	7 dias	14 dias
Controle x I	p = 0,2143	p = 0,2143
Controle x II	p = 0,5	p = 0,2143
Controle x III	p = 0,5	p = 0,2143
I x II	p = 0,2143	p = 0,2143
I x III	p = 0,5	P = 1
II x III	p = 1	p = 0,2143

Legendas: Controle: sem tratamento; G I: tratado com Laser 660nm 40mW; G II: tratado com membrana de biocelulose; G III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose
Nota: Nos tempos de 24h e 14 dias todos os animais apresentavam resultados idênticos (crosta total e ausente , respectivamente)
Significância estatística com $p < 0,05$

4.2.4 ALTERAÇÕES DAS BORDAS EPITELIAIS

Comparando-se, de forma simplificada, os grupos experimentais quanto a presença ou ausência de acantose ou esponjose, através do tratamento estatístico dos dados, pelo teste Exato de Fisher, verificou-se diferenças relevantes após 7 dias entre os grupos controle e III (Laser e Membrana) ($p=0,0143$), I (Laser) e III (Laser e Membrana) ($p=0,0143$) e II (Membrana) e III (Laser e Membrana) ($p=0,0143$). Também foram significantes os resultados encontrados após 14 dias entre os grupos I (Laser) e III (Laser e Membrana) ($p=0,0143$) e II (Membrana) e III (Laser e Membrana) ($p=0,0143$) (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13: Análise estatística da evolução da acantose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	7 dias	14 dias
Controle x I	$p = 1$	$p = 0,21$
Controle x II	$p = 1$	$p = 0,21$
Controle x III	$p = 0,01$	$p = 0,21$
I x II	$p = 1$	$p = 1$
I x III	$p = 0,01$	$p = 0,01$
II x III	$p = 0,01$	$p = 0,01$

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Nota: Nos tempos de 24h e 14 dias todos os animais apresentavam resultados idênticos em todos os espécimes

Significância estatística com $p < 0,05$

Tabela 14: Análise estatística da evolução da espongiose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	24h	3 dias
Controle x I	p = 1	p = 0,5
Controle x II	p = 0,5	p = 0,5
Controle x III	p = 0,01	p = 0,24
I x II	p = 0,5	p = 1
I x III	p = 0,01	p = 0,5
II x III	p = 0,5	p = 0,5

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose ; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Nota: Significância estatística com $p < 0,05$

Com relação a degeneração hidrópica e excitose, a análise destes seguindo o mesmo padrão descrito no parágrafo anterior não foram encontrados dados estatisticamente significantes em nenhum dos tempos experimentais, como pode ser observado nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Análise estatística da evolução da degeneração hidrópica nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	24h	3 dias
Controle x I	p = 0,01	p = 1
Controle x II	p = 0,5	p = 1
Controle x III	p = 0,5	p = 0,21
I x II	p = 0,5	p = 1
I x III	p = 0,5	p = 0,21
II x III	p = 0,24	p = 0,21

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Nota: Significância estatística com $p < 0,05$

Tabela 16: Análise estatística da evolução da exocitose nos grupos experimentais (Teste exato de Fisher/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	3 dias	7 dias	14 dias
Controle x I	p = 0,5	p = 1	p = 0,5
Controle x II	p = 0,5	p = 0,21	p = 1
Controle x III	p = 1	p = 0,21	p = 1
I x II	p = 0,78	p = 0,21	p = 0,5
I x III	p = 0,5	p = 0,21	p = 1
II x III	p = 0,5	p = 1	p = 1

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Nota: Significância estatística com $p < 0,05$

4.2.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ADIPÓCITOS NA DERME RETICULAR

Aplicando-se o teste de proporções de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras independentes (Software BioEstat 4.0) aos grupos experimentais, comparando-os entre si, ao longo de todo o período experimental, não foram detectadas diferenças relevantes estatisticamente.

4.2.6 ANALISE MORFOMETRICA DOS MASTOCITOS NA LESÃO

Após 24 horas observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e todos os demais grupos, I (Laser) ($p=0,01$), II (membrana) ($p=0,01$) e III (Membrana e Laser) ($p=0,04$) (Tabela 16).

Passados três dias, só não foram verificadas diferenças relevantes quando da comparação entre os grupos Controle e II (Membrana), com $p=0,07$ e II (Membrana) e III (Membrana e Laser), com $p=0,12$.

Passados sete e 14 dias, respectivamente, só não houveram diferenças estatisticamente significantes quando da comparação entre os grupos I (Laser)

e III (Membrana e Laser), com valor de $p=0,05$ e grupos II (Membrana) e III (Membrana e Laser), com valor de $p=0,12$ (Tabela 16).

Tabela 17: Análise estatística da evolução da exocitose nos grupos experimentais (Teste Mann Whitney/ BioEstat 4.0) (Salvador/ Bahia, 2009)

	24 horas	3 dias	7 dias	14 dias
Controle x I	$p=0,01$	$p=0,01$	$p=0,01$	$p=0,01$
Controle x II	$p=0,01$	$p=0,07$	$p=0,02$	$p=0,01$
Controle x III	$p=0,04$	$p=0,01$	$p=0,02$	$p=0,02$
I x II	$p=0,38$	$p=0,01$	$p=0,01$	$p=0,04$
I x III	$p=0,07$	$p=0,02$	$p=0,05$	$p=0,04$
II x III	$p=0,05$	$p=0,12$	$p=0,02$	$p=0,12$

Legendas: Controle: sem tratamento; Grupo I: tratado com Laser 660nm 40mW; Grupo II: tratado com membrana de biocelulose; Grupo III: Tratado com Laser 660nm 40mW e membrana de biocelulose

Nota: Significância estatística com $p<0,05$

Figura 19: Análise histomorfológica do grupo controle submetido apenas a queimadura de segundo grau. (A) Aspecto da lesão restrita às zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a presença da crosta fibrinoneutrofílica (seta) e os anexos cutâneos preservados (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo em grau intenso após 24h (seta), lingüeta epitelial indicando início de reepitelização e presença de adipócitos em grau discreto na derme reticular (círculo) (H/E 100X); (C) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial (seta) (H/E 40X); (D) Lingüeta epitelial indicando regeneração epidérmica após 3 dias (seta) (H/E 100X) (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Presença de fibrose jovem (seta) após 7 dias (H/E 100X) e acantose intensa com hiperqueratose; (G) e (H) Fibrose ainda jovem (seta), preservação dos anexos cutâneos e regeneração epitelial ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, (Salvador/Bahia, 2009)

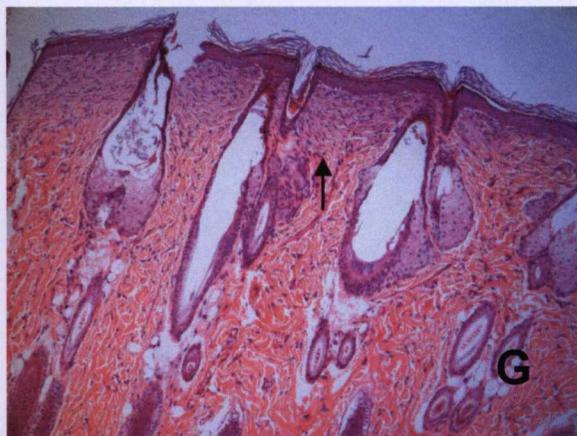
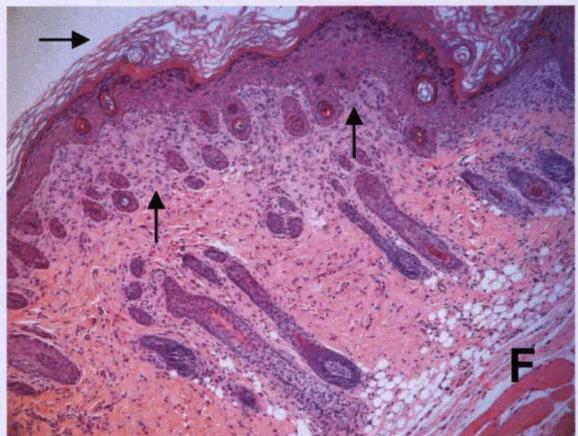
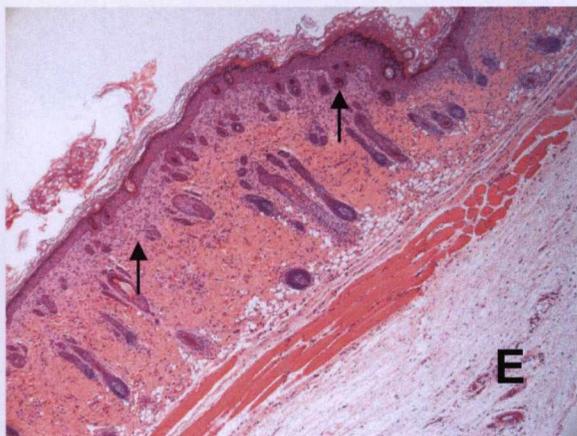
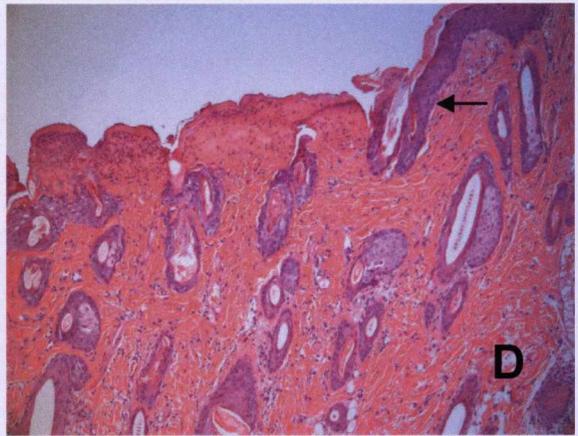
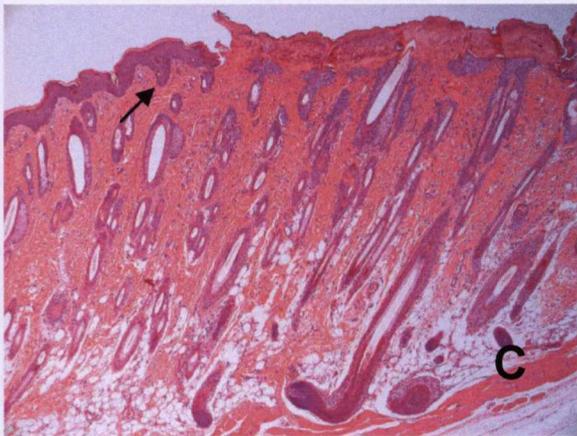
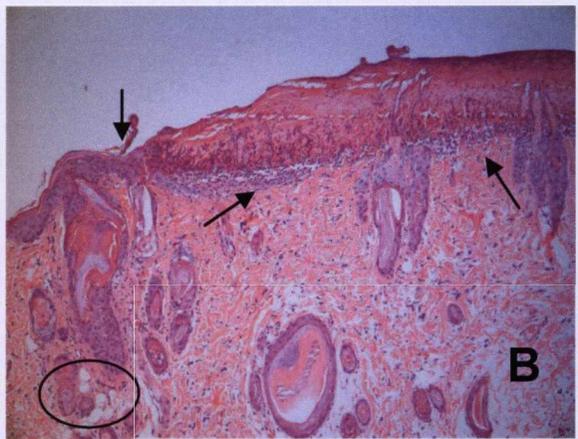


Figura 20: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo controle submetido apenas à queimadura de segundo grau (A) Adensamento das fibras colágenas, representado pela coloração mais escura, identificado após 3 dias (seta) (Picrosírius 100X); (B) Fibrose jovem após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosírius 100X); (C) Fibrose ainda jovem após 14 dias (seta) (Picrosírius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa e moderada das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular, respectivamente após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), Salvador/Bahia, 2009.

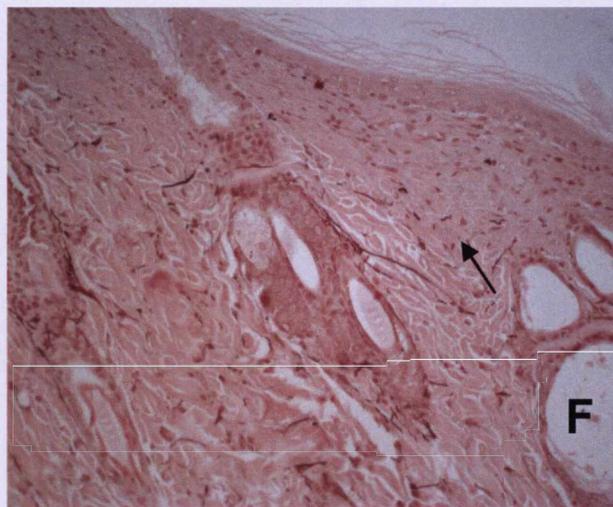
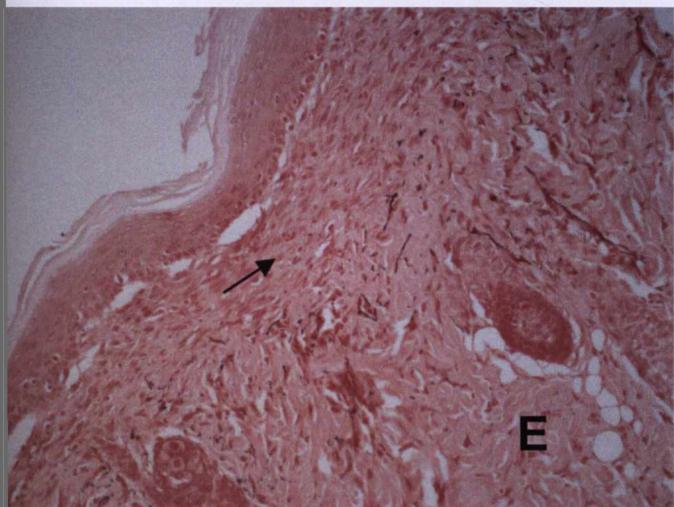
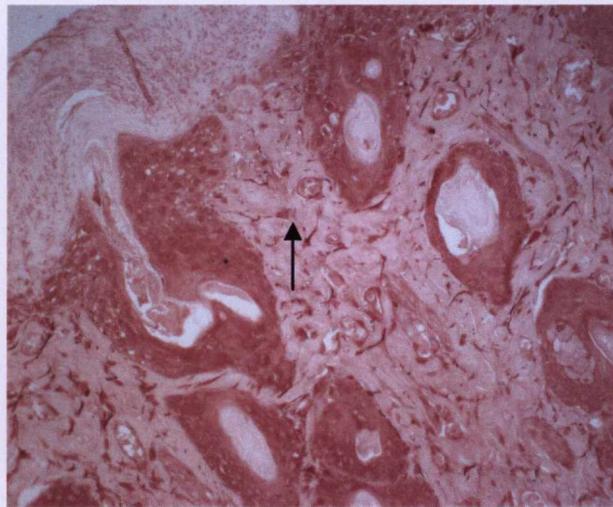
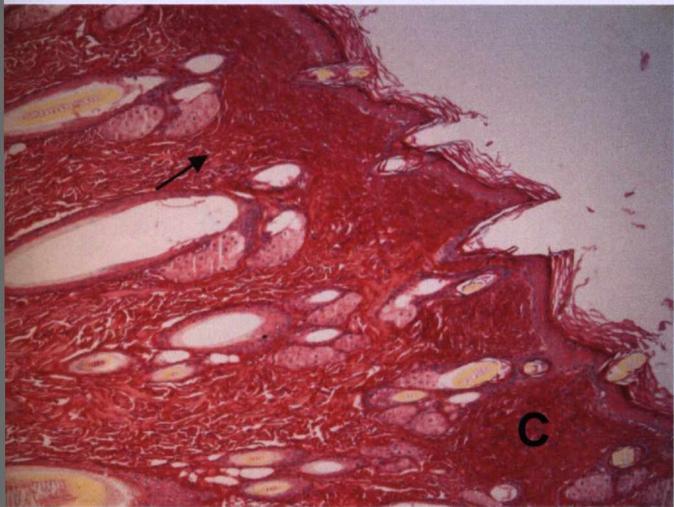
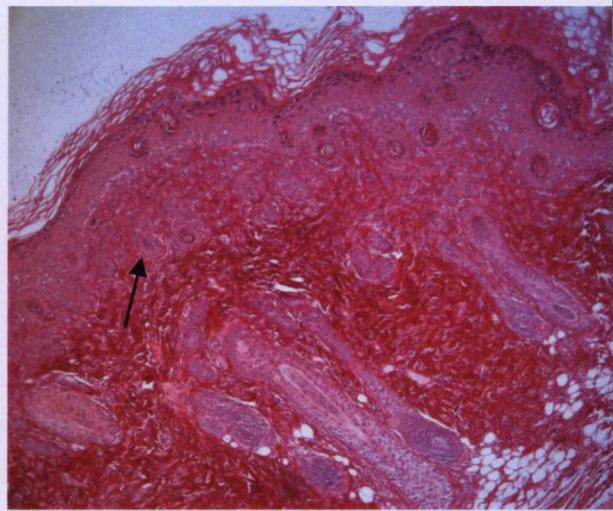
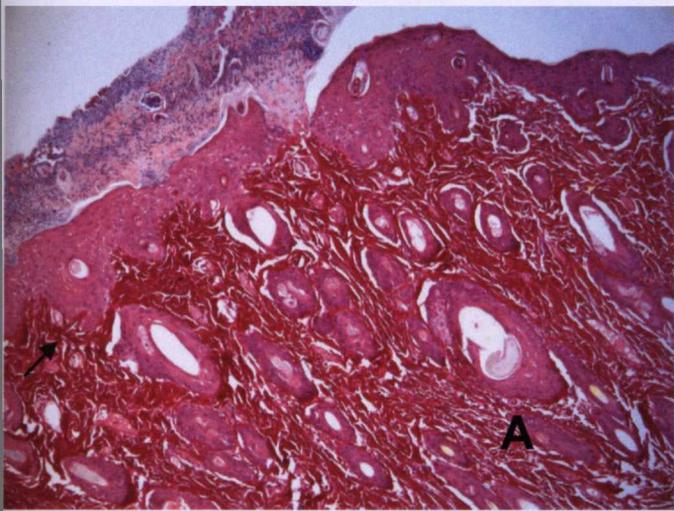


Figura 21: Análise histomorfológica do grupo I submetido a queimadura de segundo grau e submetido a terapia Laser (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a presença da crosta fibrinoneutrofílica (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo intenso após 24h (H/E 100X); (C) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque a crosta fibrino-neutrofílica espessada e a presença de infiltrado inflamatório agudo discreto (seta) e presença de células adiposas na derme reticular (círculo) (H/E 40X); (D) Aglomerado anormal de células adiposas na derme reticular após 3 dias (círculo) (H/E 100X) (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa e a presença de edema intenso e discreto infiltrado inflamatório crônico na derme (seta) (H/E 40X); (F) Visão aproximada do edema com espaçamento das fibras e células do tecido conjuntivo ao lado de foco de infiltrado inflamatório crônico (seta), vasos sanguíneos proeminentes (seta) (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose ainda jovem em grau moderado (seta) e regeneração epitelial completa ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, Salvador/Bahia, 2009

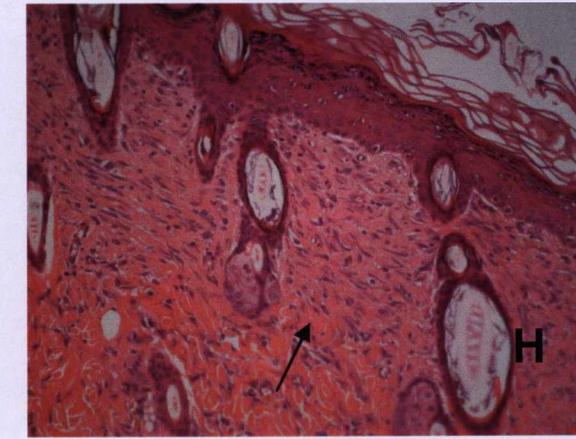
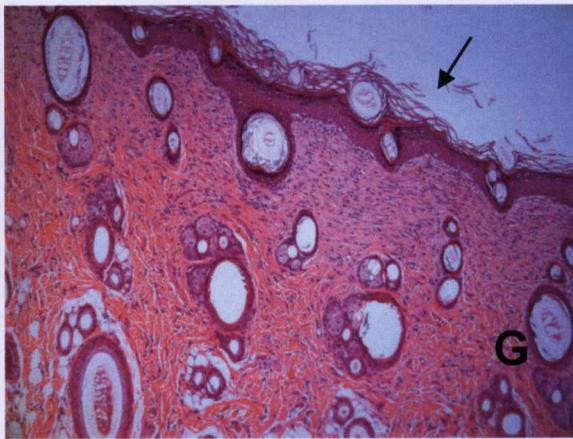
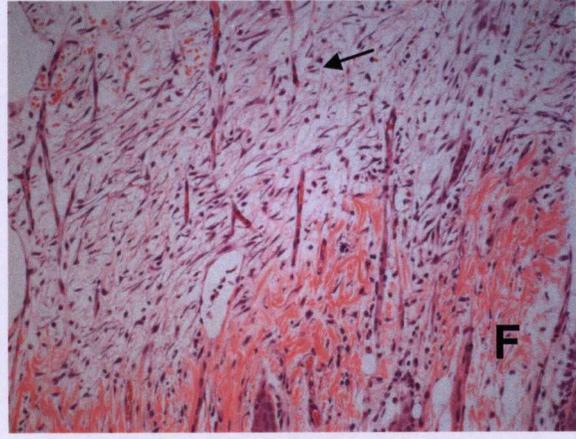
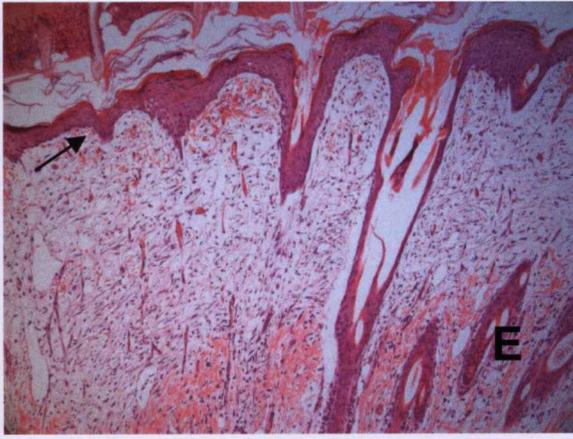
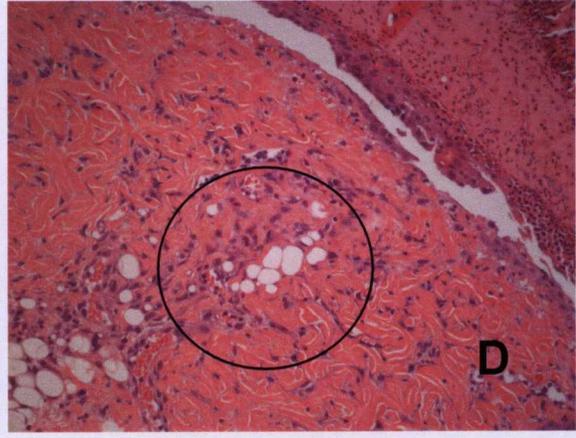
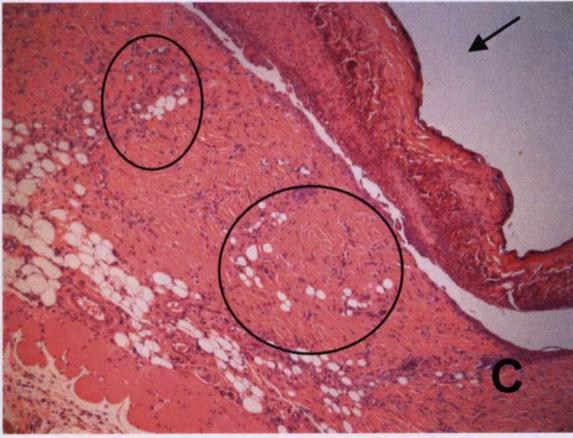
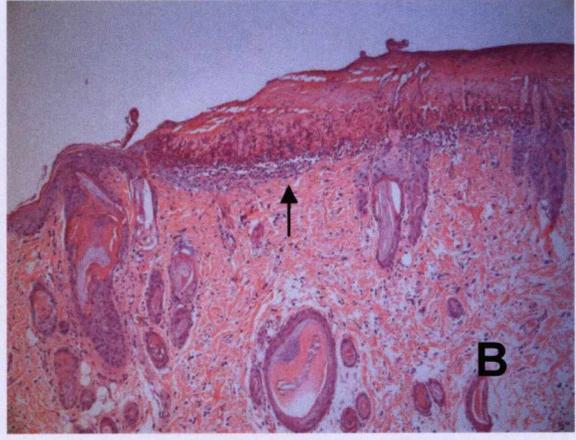
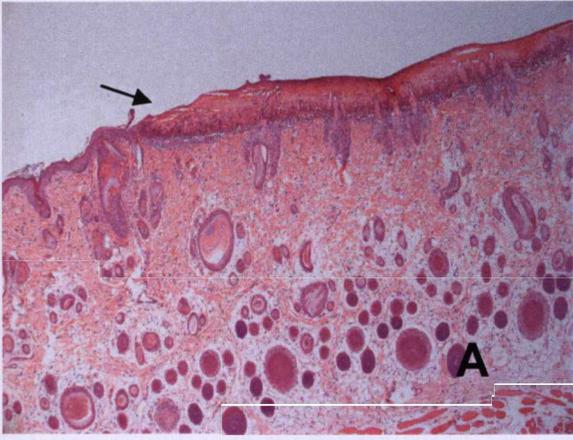


Figura 22: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo Laser submetido à queimadura de segundo grau e a terapia Laser (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias, sem fibrose evidente (seta) (Picrosirius 100X); (B) Edema intenso provocando espaçamento das fibras colágenas após 7 dias (seta) ao lado de acantose epitelial (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose moderada, ainda jovem, após 14 dias (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa nas dermes papilar e reticular, respectivamente após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução intensa e discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (Orceína 200X), Salvador/Bahia, 2009.

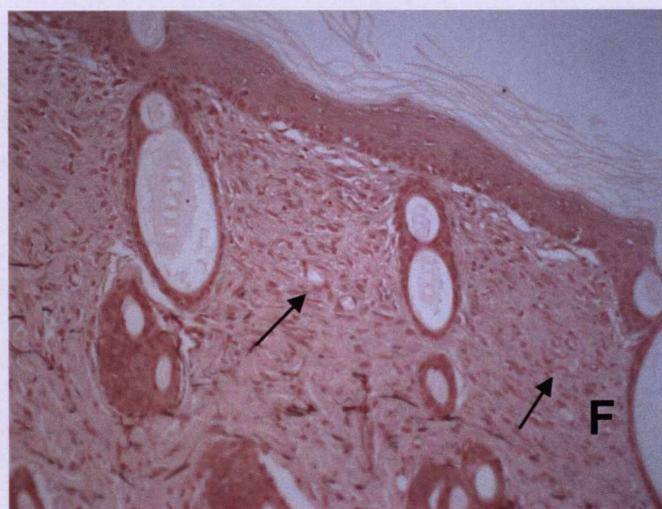
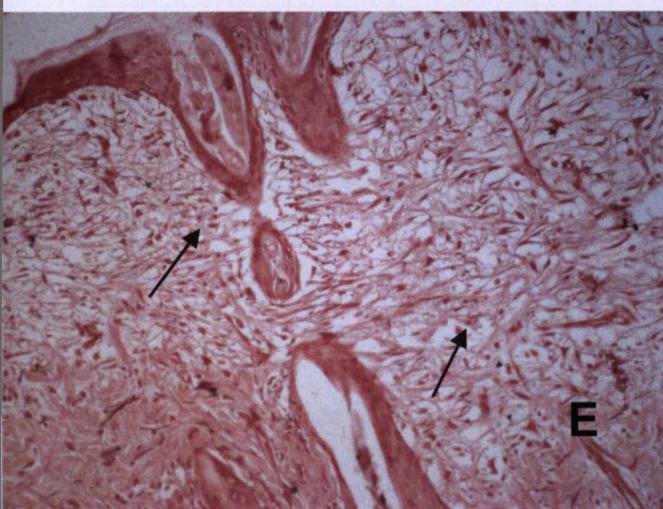
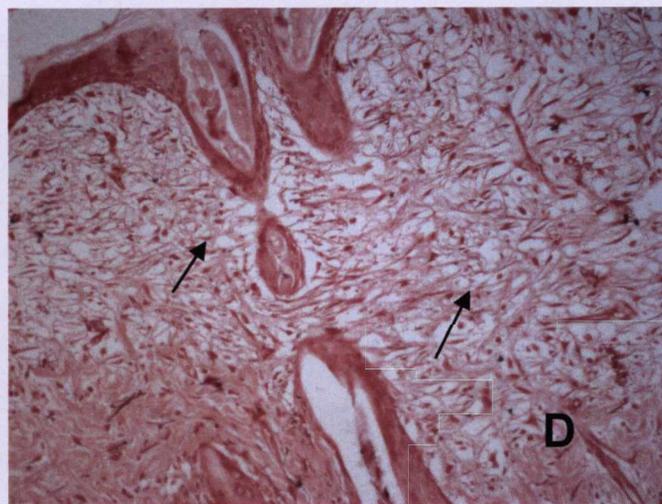
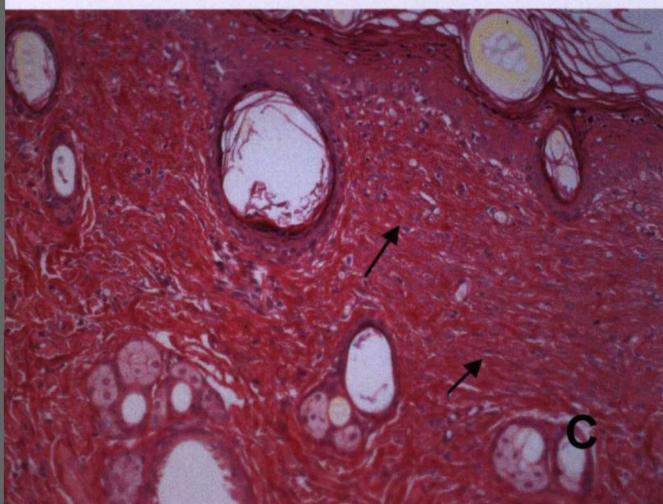
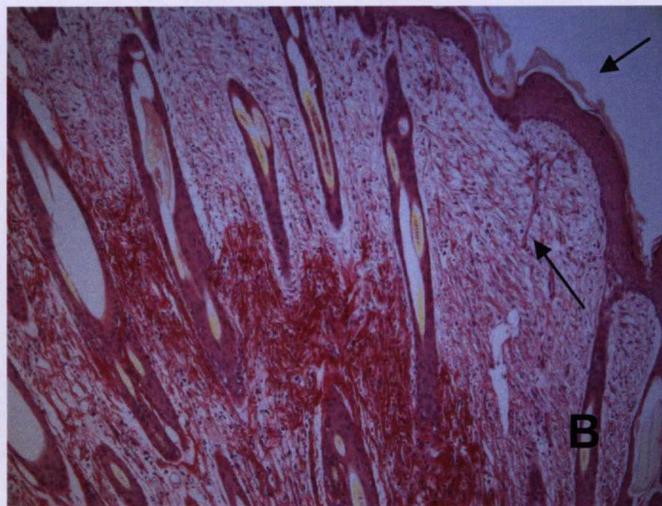
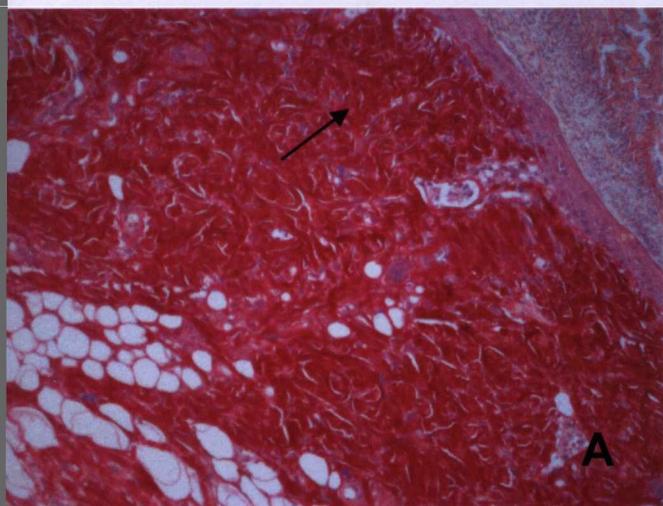


Figura 23: Análise histomorfológica do grupo II, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose. (A) Aspecto da lesão restrita às zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a adesão da membrana a crosta fibrinoneutrófilica (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo após 24h (seta) (H/E 100X); (C) e (D) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial (seta) (H/E 40X e 100X), respectivamente; (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Zonas com edema discreto (seta) e presença de células adiposas em grau moderado na derme reticular (círculo) após 7 dias (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose ainda jovem (seta) e regeneração epitelial ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, Salvador/Bahia, 2009

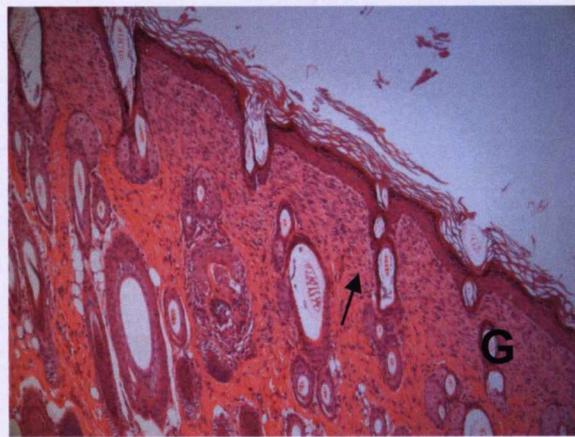
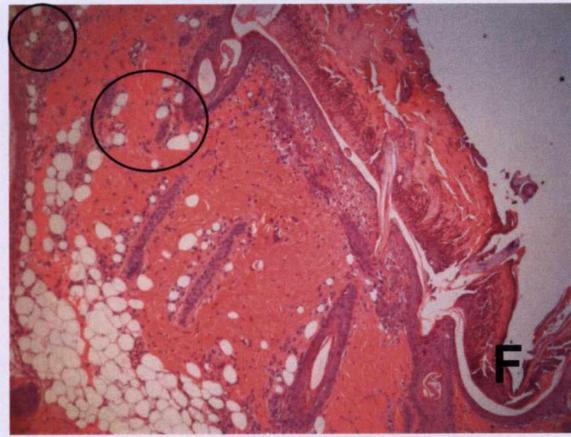
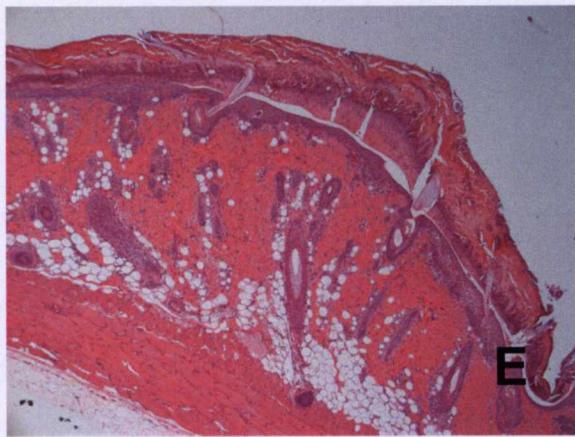
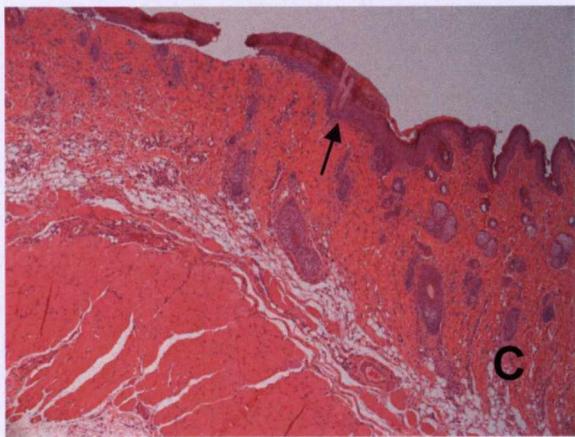
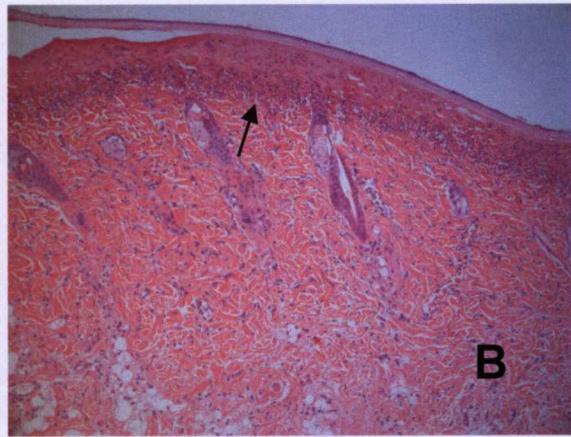
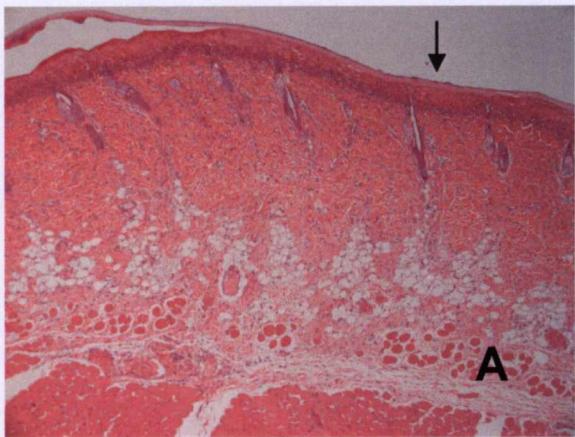


Figura 24: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo II, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias (seta) (Picrosirius 100X); (B) Fibrose jovem após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose ainda jovem após 14 dias (seta) (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução moderada das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular (seta) e presença de células adiposas na derme reticular (círculo), após 7 dias (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), Salvador/Bahia, 2009.

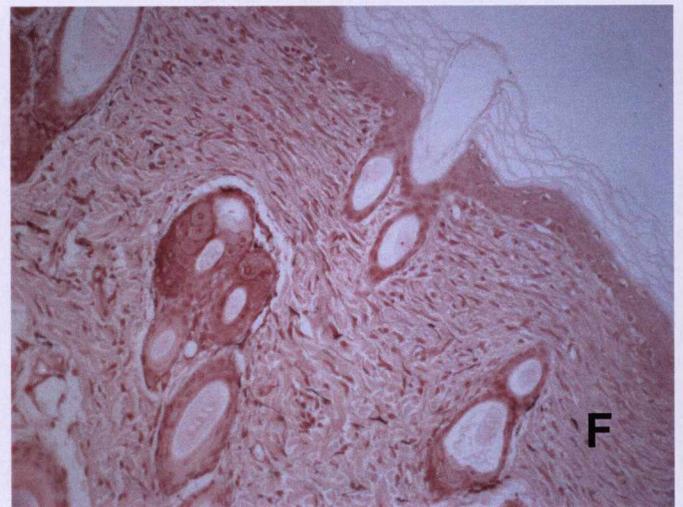
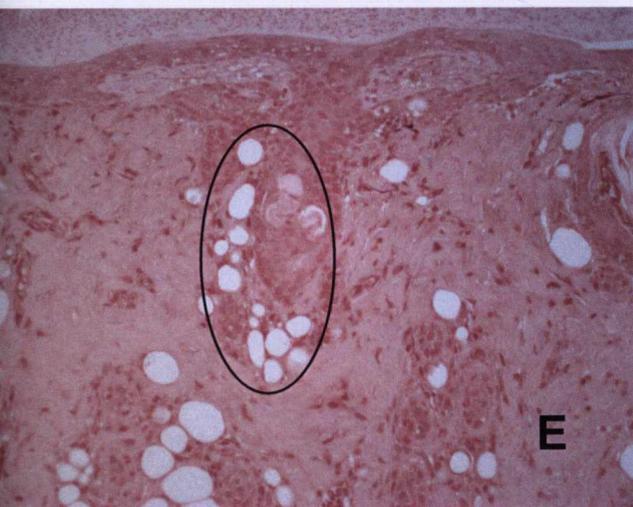
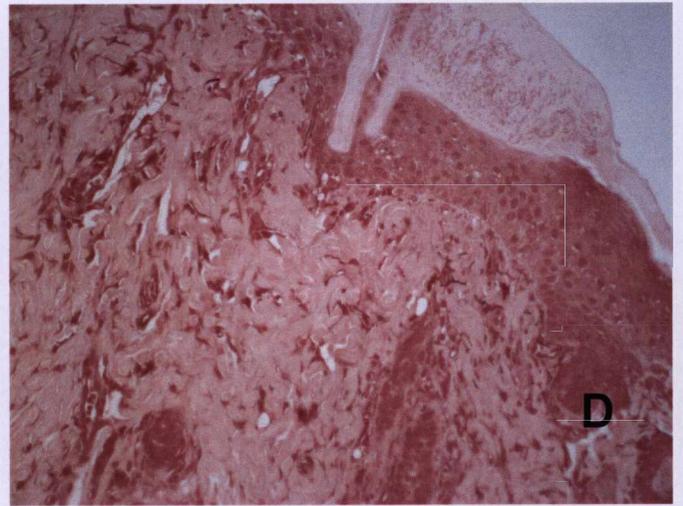
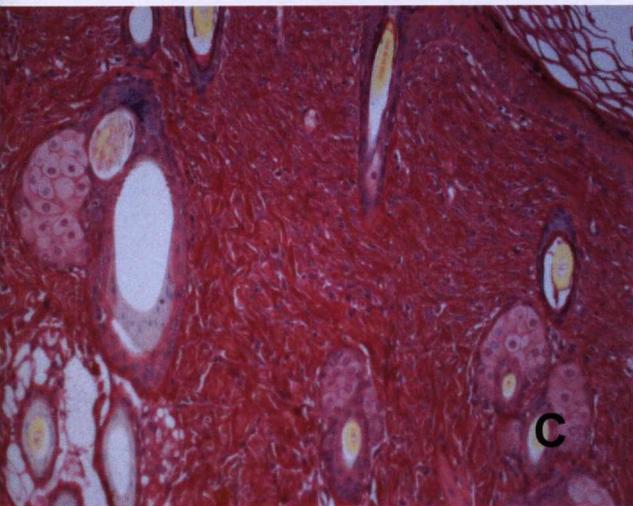
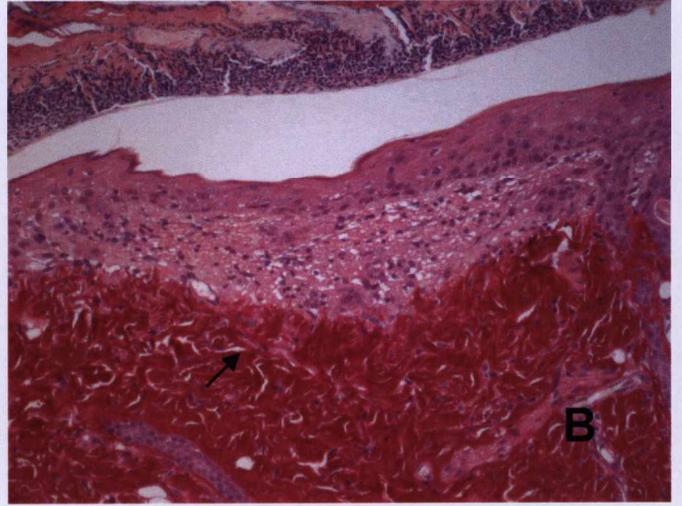
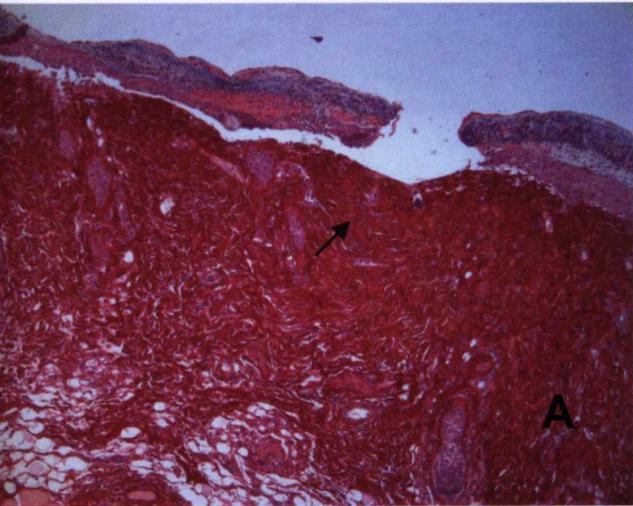


Figura 25: Análise histomorfológica do grupo III, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose e terapia Laser. (A) Aspecto da lesão restrita as zonas mais superficiais da derme, após 24h, em destaque a adesão da membrana à crosta fibrinoneutrófila (seta) (H/E 40X); (B) Presença de infiltrado inflamatório agudo intenso e de células adiposas na região perianexial da derme reticular em grau discreto após 24h (círculo) (H/E 100X); (C) Após 3 dias, regeneração epitelial parcial e infiltrado inflamatório misto em grau discreto (seta) e presença de células adiposas na derme reticular em grau discreto (círculo); (D) Aspecto da lesão após 3 dias, em destaque regeneração epitelial parcial e infiltrado inflamatório misto em grau discreto (seta) (H/E 40X e 100X), respectivamente; (E) Aspecto da lesão após 7 dias, em destaque a regeneração epitelial completa (seta) (H/E 40X); (F) Regeneração epitelial completa e infiltrado inflamatório misto discreto (seta) após 7 dias (H/E 100X); (G) e (H) Fibrose moderada, ainda jovem, (seta) e regeneração epitelial completa ao final dos 14 dias experimentais (H/E 40x e 100X) respectivamente, Salvador/Bahia, 2009

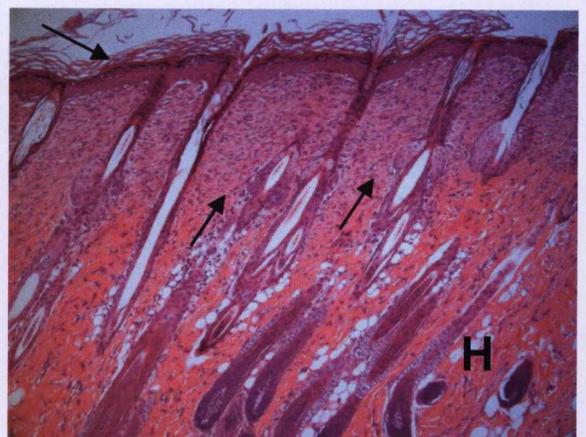
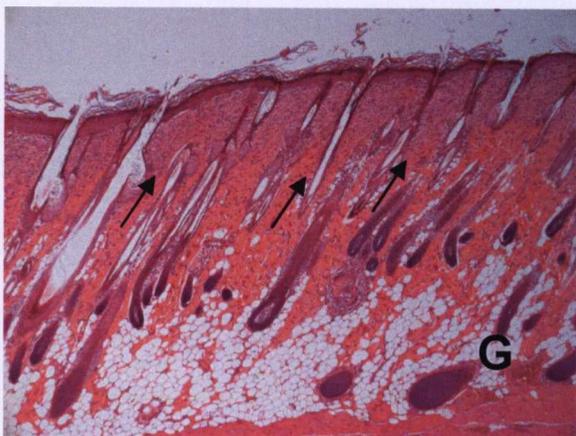
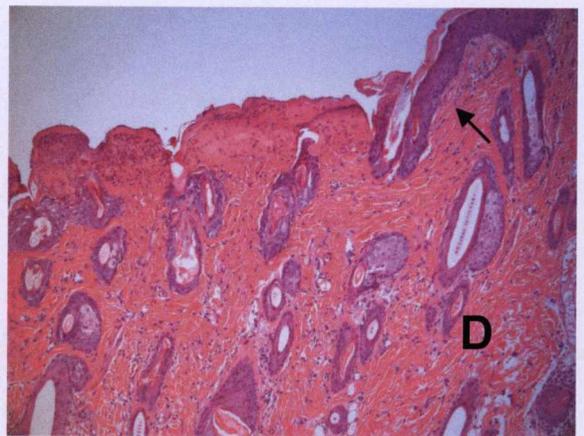
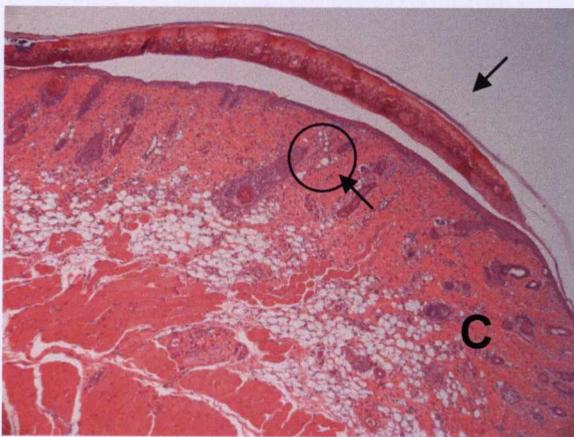
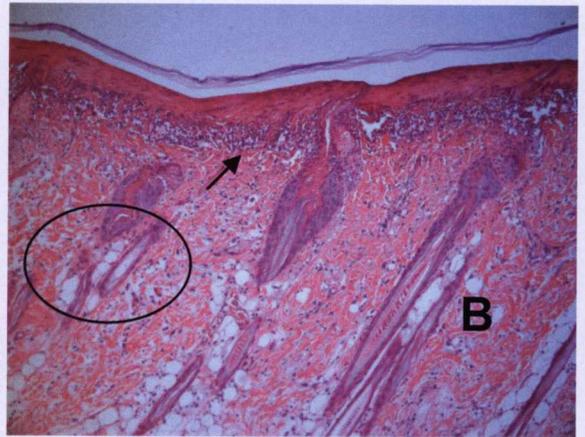
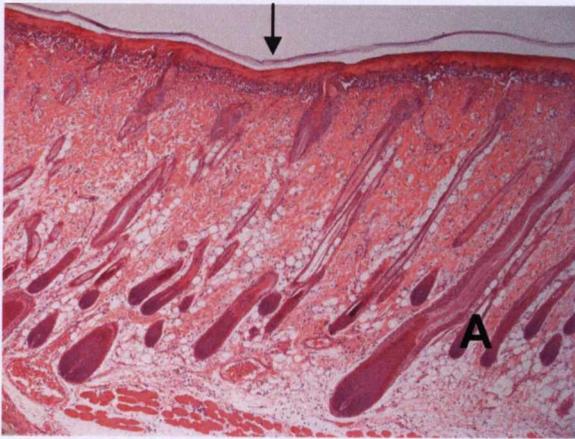
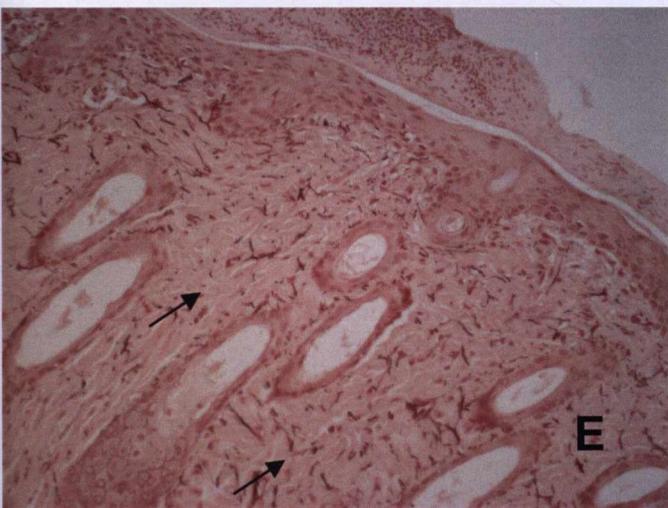
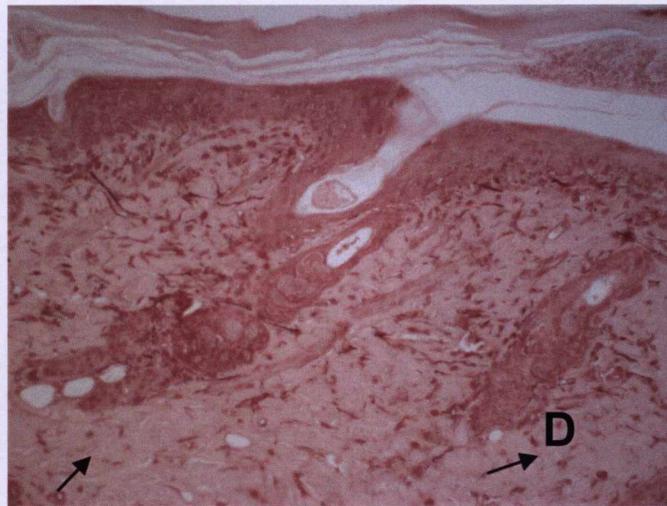
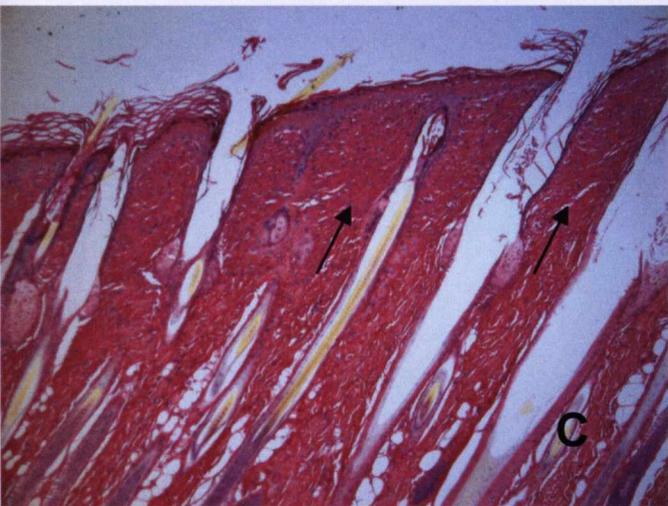
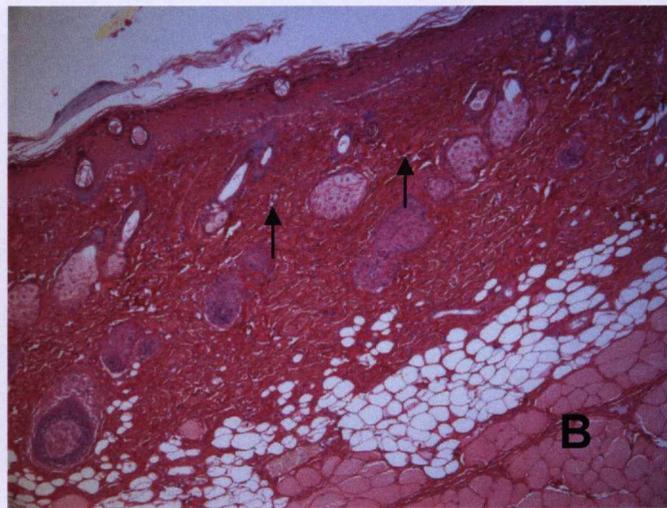
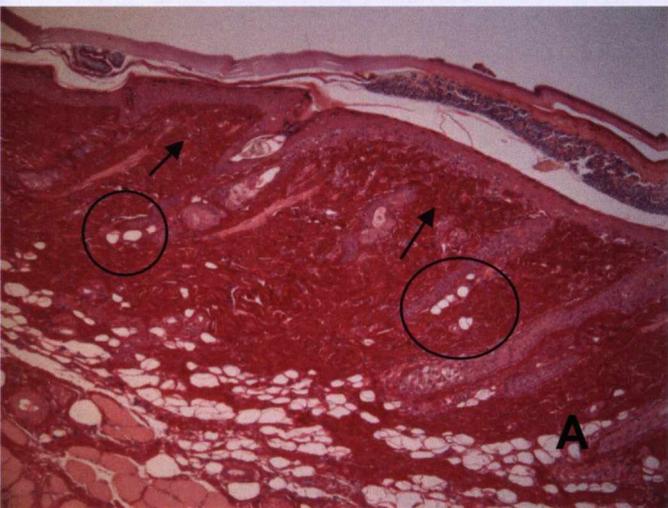


Figura 26: Análise da fibrose e das fibras elásticas do grupo III, submetido à queimadura de segundo grau e tratado com membrana de biocelulose e terapia Laser (A) Adensamento das fibras colágenas identificado após 3 dias (seta) e foco de metaplasia adiposa (círculo) (Picrosirius 100X); (B) Fibrose jovem, em grau moderado, após 7 dias da indução da lesão (seta) (Picrosirius 100X); (C) Fibrose ainda jovem, em grau moderado, após 14 dias (seta) (Picrosirius 100X); (D) Redução discreta das fibras elásticas nas dermes papilar e reticular após 3 dias (seta) (Orceína 200X); (E) Redução, intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 7 dias (seta) (Orceína 200X); (F) Redução das fibras elásticas intensa e moderada nas dermes papilar e reticular, respectivamente, após 14 dias (seta) (Orceína 200X), Salvador/Bahia, 2009.



5. DISCUSSÃO

O estudo do comportamento fisiopatológico das queimaduras representa, até o presente momento, um grande desafio no que diz respeito ao estabelecimento de modelos experimentais de indução que consigam reproduzir de forma fidedigna o comportamento dessa agressão, tão peculiar. No que tange as características dermatológicas o modelo animal que mais se assemelha ao ser humano é o suíno (COSTA e SOUZA, 2005). Por possuir um porte médio, porém, muitas vezes sua utilização é inviabilizada sob o ponto de vista econômico e prático. Embora não seja o padrão ouro, para um estudo dessa natureza, o baixo custo e facilidade de manipulação dos ratos e camundongos compõem o modelo animal mais amplamente empregado para este fim (SCHLAGER *et al*, 2000; BAYAT *et al*, 2005; MEIRELLES *et al*, 2008 (a)).

Considerando a dificuldade do estudo das queimaduras, em específico, daquelas que se limitam as regiões mais superficiais da pele como as de segundo grau, o presente estudo teve como objetivo inicial a implementação de um método capaz de reproduzir uma lesão que se limitasse à derme superficial sem comprometer os anexos cutâneos. Embora existam muitos estudos que contemplem a terapia Laser de baixa potencia, até o presente momento não foi referendado no meio científico a associação deste a membrana de celulose microbiana no tratamento das queimaduras de segundo grau. Assim, alcançado o primeiro objetivo, numa segunda etapa também foi foco deste estudo a avaliação comparativa da eficácia da associação da terapia Laser de baixa potência a membrana de celulose microbiana no tratamento das queimaduras de segundo grau.

Levando em consideração as recomendações do fabricante da membrana de celulose microbiana NEXFILL[®], que restringem o uso do material a lesões superficiais que não ultrapassem, em profundidade, os anexos cutâneos (FIBROCEL, 2006) bem como, dos requisitos clínicos adotados pela Unidade de Queimados do Hospital Geral do Estado da Bahia, em um primeiro

momento o presente estudo foi dedicado ao estabelecimento de uma lesão que preenchesse esses requisitos das queimaduras de segundo grau. Assim, utilizou-se, a princípio, o método estabelecido por Meyer em 1999, modificando-se o tempo de contato do instrumento indutor com a pele dorsal do animal de 20 segundos para 0,5 segundos visando à limitação da profundidade da lesão, objetivo este alcançado com sucesso. Isso foi confirmado em diversos ensaios piloto monitorados pelo exame histopatológico.

Durante a construção da metodologia também foi levada em consideração a densidade de energia Laser que seria empregada, de forma que o protocolo adotado foi então baseado em trabalhos publicados por Pinheiro *et al*, 2004 (modelo convencional de feridas incisionais); Meirelles, 2005 (queimaduras de terceiro grau induzidas em ratos diabéticos); Soares, 2006 (modelo convencional de feridas incisionais comparado a feridas induzidas por fotoablação com laser de CO₂) e Meirelles, *et al*, 2008 (b) (queimaduras de terceiro grau induzidas em dorso de ratos); e que verificaram efeito biomodulador positivo, quando da utilização da densidade de energia de 20J/cm² distribuídos em quatro pontos com intervalos de 48h entre as aplicações.

Em função do tamanho mínimo analisável da amostra de animais (contendo cada subgrupo apenas quatro exemplares), utilizada no presente estudo, muitos resultados que se demonstram visivelmente diferentes entre os grupos não apresentaram, entretanto, relevância estatística. Um outro dado importante, no que se refere a análise estatística, diz respeito a natureza desses dados já que por tratar-se de um estudo semi-quantitativo eram do tipo qualitativo, sendo assim aplicáveis apenas os testes não paramétricos, menos robustos que os teste paramétricos.

Para a avaliação das alterações de natureza inflamatória o tecido conjuntivo da pele/hipoderme teve suas três camadas analisadas, individualmente, com o objetivo de se estudar as alterações que se davam além da região afetada diretamente pelo calor, bem como a dinâmica do fluxo

dos elementos inflamatórios que advêm das regiões mais vascularizadas dos tecidos, no caso derme profunda e hipoderme, principalmente.

Assim, no que tange às alterações de natureza inflamatória, em um primeiro momento a maioria dos grupos evoluiu seguindo, basicamente, o mesmo curso, nas três camadas analisadas (derme papilar e reticular e hipoderme), partindo de um processo agudo em direção à cronificação deste. A partir do sétimo dia, porém, essa via unidirecional de desenvolvimento parece ter sido invertida no grupo I, tratado apenas com Laser, já que neste observou-se edema em grau intenso na derme papilar e moderado na derme reticular, em todos os seus espécimes, divergindo dos demais grupos em que o edema estava ausente ou se apresentava em grau discreto, tanto na derme papilar quanto na derme reticular e hipoderme. Meirelles *et al* (a) verificaram, em 2008, resultados que também divergem dos encontrados no presente estudo já que comparando a terapia Laser com dois comprimentos de onda distintos (660nm e 780nm, 35mw, 20J/cm²) no tratamento de queimaduras de terceiro grau. Ao final do experimento os autores observaram efeito biomodulador positivo com ambas as faixas do infravermelho e do vermelho, sendo o laser vermelho mais eficaz nos momentos iniciais do processo cicatricial enquanto o Laser infravermelho mostrou-se mais efetivo na estimulação de uma transformação do tecido cicatricial recém-formado em uma nova derme.

Outros estudos, ao contrário daquele mencionado anteriormente, concordam com os nossos resultados uma vez que nestes não foram verificados efeitos benéficos quando da instituição da laserterapia como agente acelerador do processo reparativo de queimaduras. Um exemplo disso é o ensaio de SCHLAGER *et al* conduzido em 2000 em que queimaduras induzidas em ratos que foram tratados diariamente com laser diodo (670nm, 250mW, 2J/cm²) e analisadas após 10, 20 e 30 dias da indução destas, não sendo por sua vez detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e os não tratados. Na análise de Bayat *et al*, realizada em 2005, abordando as queimaduras de segundo grau induzidas em dorso de ratos e tratadas com Laser He-Ne (632,8 nm, 10mW, 1,2 /2,4J/cm²) também não foram verificadas quaisquer diferenças entre os grupos tratados e não

tratados. Também em 2006, Bayat *et al* trataram queimaduras de terceiro grau, utilizando os mesmos parâmetros do ensaio de 2005, não alcançando qualquer efeito positivo significativo quando da comparação dos grupos tratados com os não tratados.

No sétimo dia experimental deste estudo foi observado no grupo I, tratado apenas com Laser, edema em grau intenso sendo este resultado discrepante em relação aos demais grupos. Tal alteração poderia ser em parte atribuída à quantidade de energia aplicada possivelmente representando uma sobrecarga ao sistema biológico. Se levassemos em consideração a conhecida atividade do Laser sobre os mastócitos estimulando tanto a sua proliferação quanto migração e degranulação (BAYAT, 2008; VASHEGHANI *et al*, 2008; SAWASAKI *et al*, 2009) seria possível supor que um excesso de energia tivesse alterado a homeostasia dessas células provocando assim degranulação mais prolongada e propiciando a manutenção do processo inflamatório e do edema.

Em um segundo ensaio porém envolvendo a quantificação dos mastócitos, no sítio da lesão verificamos que no grupo I (Laser), após sete dias, não houve aumento em número destas. Somado ao fato de que neste momento o grupo I exibiu um grande número de vasos recém formados talvez se possa sugerir que este edema não tenha uma origem inflamatória e sim meramente vascular. Uma das causas reconhecidas de extravasamento de líquido para o meio extra-vascular são as junções ainda mal definidas entre as células endoteliais dos vasos recém formados, que literalmente permitem que o fluido vascular goteje (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O Laser de baixa intensidade preserva a capacidade de estimular a neoangiogenese (GENOVESE, 2008; MEIRELLES *et al*, 2008 (a) e (b)) e assim, levando em consideração a presença mais pronunciada de novos vasos no grupo I (Laser) e da referida possibilidade destes representarem uma causa do aumento da permeabilidade vascular, esta pode ser uma justificativa plausível para o edema de graduação intensa presente neste grupo após sete dias.

Al Watban e Delgado verificaram também em 2005, a intensificação do edema nos grupos submetidos a laserterapia após 7 e 9 dias em ensaio envolvendo a atividade do Laser diodo (670nm, 200-220mW, 1 a 5J/cm²) sobre feridas incisionais ou queimaduras induzidas em ratos, embora não tenham discutidos as causas de tal achado. Os mesmos autores em 2007 utilizando o mesmo modelo experimental descrito, anteriormente, afirmaram que doses a partir de 19J/cm² podem retardar ou prejudicar processo cicatricial.

Considerando, também, a DE total de 20Jcm² utilizada no presente estudo como uma quantidade excessiva de energia podemos deduzir que o efeito potencialmente benéfico que poderia ser alcançado numa lesão mais extensa ou em um sistema metabolicamente comprometido como ocorre no Diabetes Melitus (AL WATBAN, 2009) se transformou no caso deste estudo em uma sobrecarga as células que tinham plenas condições de se recuperar como já relatado por Karu (1989) e Lucas *et al*, (2005).

Em 2007, Houreld e Abrahamse avaliaram a atividade do laser vermelho He-Ne (632,8 nm) sobre culturas de fibroblastos em duas doses diferentes 5J/cm² e 16J/cm², utilizado os seguintes critérios: citotoxicidade, apoptose morfologia e dano ao DNA. Os resultados deste ensaio corroboram com as observações do presente estudo já que eles verificaram efeito inibitório a migração celular e dano genético quando da utilização da dose de 16J/cm² enquanto o efeito oposto foi alcançado com a dose de 5J/cm².

Em humanos a eficácia clinica de tal terapia tem sido demonstrada dia após dia (HOPKINS, *et al*, 2004), principalmente em pacientes acometidos por distúrbios metabólicos sistêmicos como é o caso do Diabetes Mellitus. Em modelos experimentais, a realidade clinica mencionada também é confirmada quando da indução de alterações metabólicas importantes como o diabetes (MEIRELLES *et al* 2008 (b); MEIRELLES, 2005; AL-WATBAN *et al*, 2007; AL-WATBAN *et al*, 2009) e a desnutrição (MEIRELLES *et al*, 2006). A não reprodutibilidade dos resultados encontrados na prática clinica em alguns modelos experimentais envolvendo animais sadios pode ser, em parte,

atribuída ao próprio suposto mecanismo de ação limítrofe do Laser que envolve, por exemplo, modificações do potencial redox dos componentes da cadeia respiratória (KARU 1989; KARU, 1999) em específico do complexo IV, citocromo *c* oxidase (SILVEIRA *et al*, 2006) e aumento da produção de radicais livres indicado por PAL *et al* (2007) como dependente da densidade de energia ou fluência aplicada. De forma mais clara, tais alterações impostas a células que estejam funcionando com sua capacidade total podem ultrapassar os limites normais da mesma quebrando a homeostasia do sistema celular que deixa então de ser estimulado e pode passar a ser agredido pela luz (LUCAS *et al*, 2002).

Quanto às alterações das bordas epiteliais, a acantose (hiperplasia epitelial em especial da camada espinhosa) e a espongiose (edema intersticial) se destacaram no grupo III, tratado com a associação Laser e Membrana. A significância estatística traduzido a partir do valor de 0.014 (considerando-se o nível de significância adotado pelo programa BioEstat 4.0) na análise da acantose (7 e 14 dias) e espongiose (24h), biologicamente, pode representar a persistência do estímulo nocivo culminando em uma resposta por parte do tecido traduzida por espessamento epitelial ou acantose, decorrente da liberação de fatores de crescimento como o EGF (ECKLEY; RIOS; RIZZO, 2007). O mesmo grupo quando comparado aos demais com relação a espongiose exibiu uma diferença estatisticamente relevante após 24h de experimentação. A presença da espongiose pode representar a persistência do estímulo nocivo ao tecido que então responde com acúmulo de líquido intersticial. Embora tenham exibido diferenças estatísticas, estas alterações histológicas parecem não ter de um modo geral afetado, negativamente, a dinâmica do processo como um todo.

A crosta fibrino-neutrófila, neste estudo, foi formada a partir da necrose coagulativa, ao lado de neutrófilos e fibrina, originada pelo calor que incidiu sobre a pele do dorso do animal, com o objetivo de tamponar a ferida mantendo o microambiente trófico o suficiente para que o processo de reparo acontecesse. Sua avaliação juntamente com a regeneração epitelial não exibiu

diferenças descritivas ou estatísticas, que chamassem a atenção, entre os grupos estudados.

Quanto às fibras colágenas e fibrose, não foram verificadas diferenças relevantes, estatisticamente. Ao final dos 14 dias experimental, houve uma tendência comum a todos os grupos ao estabelecimento de uma fibrose em grau moderado. Não havendo diferenças expressas entre os grupos pode-se deduzir que as propriedades particulares da membrana, que incluem permeabilidade seletiva ao vapor d'água, semi-transparência (MAYALL *et al*, 1990), homogeneidade, pureza (VANDAMME *et al*, 1998), elasticidade (SHAH e BROWN, 2005) e nano-estrutura única (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; CZAJA; ROMANOVICZ, D.; BROWN Jr, 2004; CZAJA *et al*, 2006; 2007) não interferiram no processo cicatricial ao menos neste aspecto.

Em um contexto global a análise da fibrose corrobora com a hipótese de que uma possível superdosagem do Laser não tenha modulado positivamente tal processo, já que todos os grupos tiveram uma evolução quase que idêntica.

Sabe-se que frente a uma agressão, seja qual for a sua natureza, as fibras elásticas contidas na camada dérmica da pele tendem a ser reduzidas em função da sua difícil e lenta renovação (DAVIDSON e GIRO, 2006). No presente ensaio em todos os grupos foi verificada uma escassez dessas fibras tanto na derme papilar, mais superficial, quanto na derme reticular, mais profunda a partir do terceiro dia experimental. A derme papilar, que recebeu de forma direta a aplicação do calor, foi sensivelmente mais afetada com redução mais evidente dessas fibras quando comparada a camada subjacente. À medida que o experimento evoluía a redução das fibras elásticas tornou-se ainda mais evidente.

Um único ensaio realizado por Pugliese *et al* em 2003, em feridas incisionais contemplou a análise da atividade do Laser vermelho (670nm, 9mW, 4J/cm²), sobre a elastogênese. Neste ensaio as feridas irradiadas com dose única, apresentaram um discreto aumento dessas fibras à microscopia óptica, dados estes que divergem daqueles apresentados no presente estudo em que

houve ausência de alterações induzidas por este recurso que destacassem os grupos que o receberam dos demais, uma vez que independente da abordagem terapêutica todos apresentam considerável redução da malha elástica. Embora tal ensaio não tenha sido conduzido utilizando-se como ferida padrão uma queimadura é difícil, neste caso em isolado, extrapolar tais resultados para uma comparação hipotética com o presente estudo. Assim a divergência dos resultados pode ser atribuída a diferença entre as densidades de energia adotadas, a frequência das irradiações levando em consideração que o presente estudo empregou um montante energético 5 vezes maior ou mesmo ao tipo de lesão induzida em cada protocolo.

A quantidade possivelmente excedente de energia adotada no presente ensaio pode ter abortado o potencial indutor de elastogênese, descrito anteriormente por Pugliese *et al* em 2003, ao menos até o momento experimental de 14 dias, uma vez que a condução de um estudo mais prolongado com tempos de sacrifício mais prolongados podem identificar alterações não percebidas por nós.

Desde as primeiras 24 horas pós-indução da queimadura a derme reticular de todos os grupos analisados verificou-se a presença de células adiposas, em geral nas proximidades de folículos pilosos. Tal alteração sugerida como metaplasia adiposa, já foi mencionada em animais tratados com Laser em 2008 por Medrado *et al* e Meirelles *et al*, propondo, estes últimos, que tal alteração se deva a capacidade preservada de determinados tipos celulares pouco diferenciados de transformar-se em outros tipos celulares mediante um estímulo como a Laserterapia. Em 2006, Medrado *et al* publicaram estudo que sugeriu a capacidade do Laser em induzir ou acelerar a transformação do fenótipo do tecido adiposo multilocular ou pardo em tecido adiposo unilocular, num modelo utilizando ratos adultos.

A presença generalizada destas células em todos os grupos analisados

agressão tenha sido traduzida pelo organismo como um estímulo a hiperplasia das células adiposas ou a metaplasia uma vez que ao final dos 14 dias quando o processo cicatricial tendia a resolução tal alteração deixou de ser observada.

Não podemos afastar também a possibilidade de que tais adipócitos encontrados na derme possam representar uma infiltração adiposa advinda da hipoderme, em razão da agressão térmica. Essa sugestão deve-se ao fato de que na análise morfológica, freqüentemente, observamos as células adiposas na derme, havendo um acúmulo destes ao longo dos folículos pilosos na hipoderme.

Os resultados dos estudos que contemplam a atividade do Laser ou fototerapia sobre o processo cicatricial de queimaduras apresentam-se bastante controversos. Muitos estudos demonstram resultados positivos com aceleração do processo (MEIRELLES *et al*, 2008 (a); MEIRELLES *et al*, 2008 (b); MEIRELLES 2005) enquanto tantos outros contradizem os primeiros, demonstrando ausência de diferenças entre os grupos tratados com Laser e os controles (BAYAT *et al* 2005; BAYAT *et al*, 2007; SCHLAGER *et al*, 2000). Tão divergentes quanto os resultados analisados são os parâmetros e protocolos instituídos em cada estudo, dificultando, quase sempre, as comparações.

Até o presente momento, embora se estude amplamente o Laser e suas implicações sobre os organismos vivos, restam ainda muitas dúvidas com relação a dose exata que deve ser aplicada a cada situação em particular. Nos diversos estudos que contemplam o tema há uma discrepância evidente entre os parâmetros implementados em cada análise. Em parte tais diferenças podem ser atribuídas a constante evolução tecnológica que possibilita o surgimento constante de novos aparelhos com parâmetros variáveis. Além de todo esse avanço, por tratar-se de uma tecnologia relativamente nova e pela imensa variação das respostas dos organismos a esta modalidade terapêutica, ainda se buscam fundamentos para o estabelecimento de densidades de energia ideais para cada patologia em específico.

A ciência na atualidade tem evoluído muito no que diz respeito ao desenvolvimento no campo da bioengenharia tecidual e dos biomateriais e substitutos temporários de pele aplicáveis as mais diversas áreas da medicina, incluindo as cirurgias reconstrutoras em áreas doadoras de enxerto, dermoabrasões e queimaduras (MCNEIL, 2007). Sobre as queimaduras em especial, todo esse desenvolvimento tende a beneficiar os pacientes acometidos por tal agressão tão peculiar e dolorosa (ROSSI *et al*, 2000; TOMPKINS *et al*, 2004). Dentre tantas tecnologias desenvolvidas pode-se destacar a membrana de celulose microbiana que desde os anos 90 é apontada como um material muito promissor pelas várias razões já comentadas.

Extrapolando os comentários a esfera social, embora não tenhamos encontrado diferenças entre os grupos tratados com membrana e o grupo controle, a massificação de tratamentos que se utilizem da membrana de celulose microbiana como referendado por vários autores (MAYALL *et al*, 1990; PITANGUY *et al*, 1988) que já a testaram na clínica em humanos obtendo êxito, pode representar uma sensível redução dos custos com a estadia das internações dos queimados, medicamentos e materiais para os curativos, já que acelerando o processo e dispensando as várias trocas de curativos exigidas pelos protocolos tradicionais, há uma tendência a antecipação da alta dos pacientes.

Na experimentação poucos estudos abordaram a análise do relacionamento da membrana com o microambiente da ferida e dessa forma estudos mais aprofundados são necessários para a melhor compreensão deste intercâmbio.

A laserterapia com suas aplicações diversas apesar de ter sido foco de vários estudos experimentais e relatos de casos envolvendo o processo cicatricial de feridas incisionais ainda é muito pouco discutida como agente atenuante ou terapêutico para as queimaduras sendo assim necessários mais estudos visando estabelecer protocolos ideais para este tipo de lesão.

Com potencial biomodulador que pode estimular ou inibir as mais diversas atividades dos sistemas biológicos, o uso do Laser de baixa potencia requer cuidados no que tange a escolha correta da quantidade de energia para cada situação em específico, sendo os ensaios experimentais fundamentais para tal.

Dessa forma, os resultados aqui demonstrados não contradizem a eficácia do Laser na aceleração do processo cicatricial, mas sim indicam que mais estudos testando diferentes parâmetros precisam ser conduzidos para que seja estabelecido o melhor protocolo para a biomodulação positiva do reparo de queimaduras de segundo grau.

O presente estudo é também uma contribuição para a melhor compreensão do comportamento fisiopatológico das queimaduras de segundo grau, sendo tão importante quanto a análise histopatológica do processo de reparo desta, o estabelecimento do método de indução da queimadura em si. A associação Laser-membrana tão pouco estudada bem como o modelo recém estabelecido então abrem muitas vias para estudos subseqüentes, que incluem testes de densidades de energia mais baixas que realmente estimulem o processo, avaliação das alterações vasculares induzidas pelo Laser e pela queimadura, verificação da atividade do Laser sobre os mastócitos e suas possíveis implicações, análise imuno-histoquímica da dinâmica da formação da matriz extracelular e da proliferação celular, análise ultraestrutural dos elementos celulares envolvidos no processo e da adaptação da membrana ao leito da ferida, dentre outras diversas possibilidades.

6. CONCLUSÕES

1. O modelo apresentado no presente estudo foi capaz de induzir uma lesão que conseguiu reproduzir uma queimadura de segundo grau sem acometimento dos anexos cutâneos em ratos wistar.
2. Independente da modalidade de tratamento empregada a queimadura de segundo foi por si só capaz de induzir a redução das fibras elásticas na pele de ratos.
3. A agressão representada pela queimaduras de segundo grau parece ter sido capaz de induzir o surgimento de células adiposas na derme até o sétimo dia experimental.
4. A membrana de celulose microbiana bem como o laser não influenciaram a deposição de fibras colágenas durante o processo reparativo das queimaduras de segundo grau.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA e BHATTACHARYA Burns in the developing countries and burn disasters **Burns** v 329 n 21, 2004.
- AL-WATBAN, F. A. H.; DELGADO, G. D. Burn healing with a diode Laser: 670nm at different doses as compared to a placebo group **Photomedicine and Laser Surgery**, v 23, n 3, p. 245-250, 2005.
- ALWATBAN, F. A. H Low level Laser therapy enhances wound healing on diabetic rats: A comparison of different lasers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 25, n 2, p. 72-77, 2007.
- ALWATBAN, F. A. H Laser therapy converts diabetic wound healing to normal wound healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 27, n 1, p.127-135, 2009.
- ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais** 4 ed. Atheneu, cap 8, Rio de Janeiro, p.135-51, 1999.
- ARAUJO C. E. N.; RIBEIRO, M. S.; FAVARO, R.; ZECELL, D. M.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a feaster skin repair in He-Ne laser treated wounds **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology** v 86, p 87-96, 2007.
- ARTURSON, G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture, 1995* **Burns** v 22 n4 p 255-274, 1996.
- BAGNATO, V. S. Os fundamentos da Luz Laser **Física na escola**, v 2, n 2, p 49, 2001.
- BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review **Burns** v 27, p. 534-544, 2001.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. N.; CURI C.N. Mecanismos envolvidos na cicatrização **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v 41, n 1, p 27-51, 2005.
- BARACHINI, P.; VEZZONI, G. M.; PALOMBO, C.; FRANZONI, F.; BIGALLI, G. Skin blood flow pattern in burns outcomes **Burns**, v 30, p 312-316, 2004.
- BARBER; R. C.; CHANG, L.E.; ARNALDO, B. D.; PURDUE, B. G. F.; HUNT, J. L.; HORTON, J. W.; ARAGAKI, C. C. Innate Immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury, **Clinical medicine & Research**, v 4, n 4, p.250-255, 2006.
- BAYAT, M.; VASHEGHANI, M. M.; RAZAV, N.; TAHER, S. I. RAKHSHAN, M. Efeito da laserterapia de baixa potência na cura de queimaduras de segundo grau em ratos : um estudo histológico e microbiológico. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v 18, n 2, p.171-177, Feb, 2005.

BAYAT, M.; VASHEGHANI, M. M.; RAZAVI, N. Effect of low level helium-neon laser therapy on the healing of third degree burns in rats **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v 83, p 87-93, 2006.

BENSON, A.; DICKSON, W.A. BOYCE, D. E. ABC of wound healing: Burns **BMJ** v 332, n 18, p 649-651, 2007.

BRADAMANTE, Z.; SVAJGER, A. Pré-elastic fibres in the developing elastic cartilage of the external ear of the rat **J Anat**, v 123, n 3 p 735-743, 1977.

BRUGNERA Jr., A.; SANTOS, E. W. G.; BOLOGNA, E. D.; LARDALO, T.C.C.G.P. **Laserterapia aplicada a clínica odontológica** Ed. Santos, 1 ed., São Paulo, 2003.

BRUGNERA JR, A e PINHEIRO, A.L.B. **Laseres na odontologia**, 1 ed, Ed Pancast, São Paulo, 1998, 356p.

CAIN, S. A.; RAYNAL, B.; HODON, N.; SHITTLEWORTH, A. KIELTY, C. M. Biomolecular analysis of elastic fibre molecules **Methods** v 45 p.42-52, 2008.

COSTA, H. O.; SOUZA, F. C. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue® **ACTA/ORL Técnicas em Otorrinolaringologia**, v 23, n 3 p.23-27, 2005.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN Jr Structural investigation of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture **Cellulose**, v 11, p 403-411, 2004.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications **Biomacromolecules**, v 8, n1, p. 1- 13, 2007

CZAJA, W.; KRZYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R.M. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds **Biomaterials**, v 27, p 145-151, 2006.

DUARTE, M. E. L.; PEIXOTO, A.L.P.; PACHECO, A.; JORGETTI, V. Hiperplasia de Mastócitos na Oxaiose Óssea **Rev Ass Méd Brasil**, v 45, n 2, p. 95-98, 1999.

DORNELAS, M. T. Presidente da Sociedade Brasileira de Queimaduras alerta pra riscos por causa de Fogos. **Diretoria de Comunicação – UFJF** Jun, 2008.

ECKLEY, A. A.; RIOS, L. S.; RIZZO, L. V. Estudo comparativo da concentração salivar do fator de crescimento epidérmico em indivíduos com laringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e após o tratamento: resultados preliminares **Rev Brás Otorrinolaringol** v 73, n 2 p 156-60, 2007.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development **Nature**, v 445, n 22, p.834-841, 2007.

FIBROCEL, NEXFILL[®]: O curativo biológico de última geração. Disponível em: <http://www.fibrocel.com.br/produtos.asp>, Capturado em: 23/10/2006.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Loise, 2008, 170p.

GENOVESE, W.J.; BRUGNERA Jr, A.; VILLA, R.G. **Laser na Odontologia**, ed Pancast, São Paulo, 1991.

GOLDIN, J. R. **Pesq. Saúde: Normas leis e diretrizes 2** ed Porto Alegre: HCPA, 1995, 85p.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing **Ann N. Y. Acad Sci** v 1056 p 486-493, 2005.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE Time dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v 88, p 147-155, 2007.

HEITTIARATCHY, S.; DZEWULSKI, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. **BMJ**, p.1427-9, 2004.

HOURELD, N. e ABRAHAMSE, H. *In vitro* exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a He-Ne Laser at 5 and 16 J/cm² **Photomedicine and Laser Surgery**, v 25, n 2, p 78-84, 2007.

HOPKINS, J. T.; MACLODA, T. A.; SEEGMILLER, J. G.; BAXTER, G. D. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: A triple blind, sham-controlled study **Journal of Athletic Training**, v 39, n 3, p 223-229, 2004.

HUDSPITH e RAYATT ABC of burns First aid and treatment of minor burns **BMJ**, v 328, n 19, jun, 2004

JANEWAY; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHICK **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**, 6 ed, Ed Art Méd, 2006.

JOSE, R. M.; ROY, D. B.; VIDYADHARAN, R.; ERDMANN, M Burns area estimation an error perpetuated **Burns**, v 30, p. 481-482, 2004.

JUNQUEIRA e CARNEIRO **Histologia Básica**, Ed Guanabara Koogan, 11 ed, 2008, 524p.

KAVANAGH, S.; JONG, A. Care of burn patients in the hospital **Burns**, v 30 A2-A6, 2004.

KARU, T. Photobiology of low power Laser effects **Health Physics** v 56 n 5 may, p.691-704, 1989

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near IR radiation on cells **J Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v 49, p1-17, 1999.

KUMAR; ABBAS; FAUSTO **Robbins & Cotran Patologia Bases Patológicas das Doenças**, Ed Saunders, 7 ed, 2005, 1592 p.

KADLER, E. K.; HILL, A.; CANTY-LAIRD, E.G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin integrins and minor collagens as organizers and nucleators. **Curr Opin Cell Biol** v 20 (5-24), p 495-501.

LUCAS, C.; POUBLON-CRIENS, L. J.; COCKRELL, C. T.; HAAN, R. J. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; Were clinical studies justified? A systematic review **Lasers Med Sci**, v 17, p. 110-134, 2002.

MACEDO, N. L.; NETTO, R. L.; LIMA, F. R.; KERBAUY, W. D.; JARDINI, M. A. N. Regeneração tecidual dirigida **RGO** v 41, n 3, mai/jun, p.149-152, 1993.

MACEDO, J. L. S.; ROSA, S. C.; CASTRO, C. Sepsis in burned patients **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v 36, n6 nov-dez, p.647-652, 2003.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin **Nature** v 455, n 22, p 874-879, 2007.

MAHAJAN, A. L.; TENORIO, X.; PEPPER, M. S.; BAETENS, D.; MONTANDON, D.; SCHLAUDRAFF, K. U.; PITTET, B. Progressive tissue injury in burns is reduced by rNAPc2 **Burns** v 32 p 957-963, 2006.

MAIMAN, T. M. Stimulated optical radiation in ruby **Nature** v 187 n 4736, 1960.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte II **An Bras Dermatol** v 78 n 5, p 525-542, 2003.

MAURER, M; THEOHARIDES, T.; GRANSTEIN, R. D. What is the physiological function of mast cells? **Exp Dermatol** *apud* VASHEGHANI, M. M.; BAYAT, M.; REZAEL, F; BAYAT, A. Effect of low level laser therapy on mast cell in second degree burns in rats **Photomedicine and Laser Surgery** v 26, n 1, p. 1-5, 2008.

MECHAM, R. P.; HEUSER, J. E. The elastic fibers In: HAY, E. D. **Cell Biology of Extracellular Matrix** Ed Plenum Press New York 2 ed p.79-109, 1991.

MECHAM, R.P. Methods in elastic tissue biology: Elastin isolation and purification **Methods** v 45, p32-41, 2008.

MEDRADO, A. P.; TRINDADE, E.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. Action of low level laser therapy on living fatty tissue of rats **Lasers in Medical Science**, v 21, p. 19-23, 2006.

MEDRADO, A. P.; SOARES, A. P.; SANTOS, E.T.; REIS, S. R.A.; ANDRADE, Z. A. Influence of laser photobiostimulation upon connective tissue remodeling during wound healing **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v 92, p.144-152, 2008.

MEIRELES, G. C. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RAMALHO, L.; VIEIRA, A. L. B. Biomodulative Effects of Polarized Light on the Healing of Cutaneous Wounds on Nourished and Undernourished Wistar Rats.. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 24, p. 616-624, 2006.

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

MEIRELLES, G. C. S.; SANTOS, J.; CHAGAS, P.; MOURA, A. P.; PINHEIRO, A. L. B. Effectiveness of Laser photobiomodulation at 660 or 780nm on the repair of third degree burns in diabetic rats **Photomedicine and Laser Surgery** v 26 n1, 2008 (b).

MEYER, T. N.; SILVA A. L. A. A standard burning model using rats. **Act Cir Bras.** v 14, n 4, out/nov, 1999.

MINISTERIO DA SAUDE **Alta Complexidade Queimados** Portaria n 1273, 21 de novembro de 2000 Disponível em:
sna.saude.gov.br/legisla/legisla/alta_queimados/GM_P1.273_00alta_queim.doc
c – Capturado em : 10/12/2008

MINISTERIO DA SAUDE **Manual Técnico Operacional Sistema de Informação Hospitalar**, versão preliminar, setembro de 2008, Distrito Federal Brasília, 2008.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamações: Conceitos gerais e inflamação aguda In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais** 4 ed. Atheneu, cap 6, Rio de Janeiro, p.109-28, 1999.

PAL, G.; DUTTA, A.; MITRA, K.; GRACE, K.; GRACE, M.; AMAT, A.; ROMANCZYK, T. B.; WU, X.; CHAKRABARTI, K.; ANDERS, J.; GORMAN, E.; WAYNANT, R.W.; TATA, D.B. Effect of low intensity Laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v 86, p. 252-261, 2007.

PALHARES, A. **Lesões causadas por queimaduras**. Disponível em:
http://www.emv.fmb.unesp.br/aulas_on_line/plastica/Queimados2/lesoes_queimaduras.pdf
Capturado em: 23/08/2006.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLIBARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, I.M.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Increase of próton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser **FEBS** v 175, n1, 1984.

PEIXOTO, R.; SANTOS, D. L. N. Biofill: uso e avaliação clínica de uma película celulósica em lesões cutâneas **Rev bras cir**; v 78 n 2 p.141-145, mar-abr, 1988[BIREME].

PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P. F. Utilização de película de celulose (Biofill[®]) como curativo biológico **Rev bras cir**; v 78 n 5 p.317-26, set.-out, 1988 [BIREME].

PINHEIRO, A. L. B. ; VIEIRA, A. L. B.; ALMEIDA, D.S. ; MEIRELES, G. C. S. ; NUNES, J. ; CARVALHO, C. M. . Phototherapy Improves Healing of Cutaneous Wounds in Nourished and Undernourished Wistar Rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, p. 21-28, 2004.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z .A.. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.17, n.4, out./dez., p.307-313, 2003.

PORREAU-SCHNEIDER, N. .; AHMED, A.; SOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M.; Helium-Neon Laser treatment transforms fibroblast into myofibroblasts **American Journal of Pathology** v 137, n 1, 1990.

POURZARANDIAN, A.; WATANABE, H.; RUWANPURA, S. M. P.M.; AOKI, A.; ISHIKAWA Effects of low level laser irradiation on gingival human cultured fibroblasts **Journal of Periodontology**, v 76, n 2, 2005.

RAMOS e RIBEIRO, 2002

REDDY, G.K. Photobiological basis and clinical role of low intensity Lasers in biology and medicine **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v 22, n 2, 2004

REZENDE S. B.; RIBEIRO, M.; NUNEZ, S. C.; GARCIA, V. G.; MALDONADO, E. P. Effects of a single near infra-red laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical na histological study in rats **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v 87, p. 145-153, 2007.

ROCHA JUNIOR, A. M; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An. Bras. Dermatol.**, v.81, n.2, mar/abr, p.150-156, 2006.

ROCHA JUNIOR, A. M.; VIEIRA, B. J.; ANDRADE, L.C.F.; AERESTRUP, F. M. Effects of low level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vivo experimental studies **J Vasc Bras**, v 6, n 3, p.258-265, 2007.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria **Microbiological Reviews**, v 55, n 1, p 35-38, 1991.

SANTOS, H. L.; RIGOS, C. F.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGINI, P. Biostimulation of Na,K-ATPase by low energy laser irradiation (685nm, 35mw): Comparative effects in membrane, solubilized and DPPC:DPPE- liposome reconstituted enzyme **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v 89, p.22-28, 2007.

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

SMITH, J. G. Increased elastic tissue in the dermis: the dermal elastoses **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v 43, n 3, p.173-185, 1967.

SHAH, J.; BROWN Jr, R.M. Towards paper displays made from microbial cellulose **Appl Microbiol Biotechnol** v 66, p. 352-355, 2005.

SHERIDAN, R. L. *et al.* Long-term outcome of children surviving massive burns. **JAMA**, v 283, p. 69-73, 2000.

SCHLAGER, A; OEHLER, K; HUEBNER, K. U.; SCHMUTH, M.; LUDWIG, S. Healing of burns after treatment with 670 nanometer low-power Laser light. **Plast Reconstr Surg**, v 105, n 5 apr, p. 1635-39, 2000.

SUBER, F.; CARROLL, M. C.; MOOREF. D. Innate response to self antigen significantly exacerbates burn wound depth **PNAS** v 104, n 10, p 3973-3977.

TOMPKINS, D.; ROSSI, L. Care of out patients **Burns** v 30 p. A7-A9, 2004.

VALE, E. C. S. D. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **An Bras Dermatol** v 80, p.9-19, 2005.

VANDAMME, E. J.; BAETS, S. D.; VEANBAELEN, A.; JORIS, K.; WULF, P.D. Improved production of bacterial cellulose and its application potencial **Polymer Degradation and Stability** v 99, p 93-99, 1998.

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

WATTS, A.M.; TYLER, M.P.H.; PERRY, M. E.; ROBERTS, A. H. N.; MC GROUTHER, **Burns**, v 27, p 154-160, 2001.

YASUKAWA, A.; OHRUI, H.; KOYAMAY.; NAGAI, M.; TAKAKUDA, K. The effect of low-reactive level laser therapy (LLLTL) with Helium neon Laser on operative wound healing in a rat model **Journal of Veterinarian Medical Science**, v 69 n 8, p. 799-806, 2007.