

NATÁLIA CARVALHO TREVIZAM

**AÇÃO DO LASER E DA MEMBRANA DE QUITOSANA NO
REPARO TECIDUAL EM RATOS.**

Campo Grande

2017

NATÁLIA CARVALHO TREVIZAM

**AÇÃO DO LASER E DA MEMBRANA DE QUITOSANA NO
REPARO TECIDUAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Odontologia na Universidade Federal do
Mato Grosso do Sul, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto
Ferrão Júnior.

Campo Grande
2017

NATALIA CARVALHO TREVIZAM

**AÇÃO DO LASER E DA MEMBRANA DE QUITOSANA NO
REPARO TECIDUAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Silvana**, à minha irmã **Paula** e ao meu sobrinho **Lucas**, por me proporcionarem a dádiva de provar do amor mais verdadeiro e sincero que eu poderia sentir e receber. Sem vocês, nada disso seria possível. Meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior**, pelos ensinamentos.

- Aos meus **colegas de turma**, que sempre me apoiaram e me ajudaram nesse percurso. Em especial o Diego, o Fernando e a Bárbara, que participaram efetivamente na execução dos experimentos. Sem eles, esse trabalho não seria possível.

- À **Profª Daniella Moraes Antunes** pela disponibilidade e competência na leitura das lâminas.

- Aos **membros do Biotério da UFMS**, em especial à veterinária Adriana Guercio, minha eterna gratidão!

- À minha mãe **Silvana** e à minha irmã **Paula**, por sempre acreditarem em mim, me apoiarem e estarem presente em todos os momentos da minha vida. Vocês me inspiram a ser melhor a cada dia e a lutar, diariamente, pelos meus objetivos. Devo agradecer também ao meu sobrinho **Lucas**, que chegou no meio dessa caminhada, e hoje é o dono dos meus melhores e mais sinceros sorrisos. Obrigada por tudo!!!

- Ao **Programa de Pós-graduação da UFMS** pela oportunidade.

“Enquanto puderes erguer os olhos para o céu, sem medo, saberás que tens o coração puro, e isto significa felicidade.”

(Anne Frank)

RESUMO

Trevizam, NC. Ação do laser e da membrana de quitosana no reparo tecidual em ratos. Campo Grande, 2017. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O sucesso de qualquer procedimento cirúrgico depende de uma boa cicatrização. Para otimizar esse processo, já existem na literatura trabalhos que comprovam a eficácia do uso da biomembrana de quitosana e da laserterapia de baixa intensidade (LBI), usados separadamente. Porém, ainda não existem trabalhos publicados que tenham avaliado a eficácia dos mesmos quando usados de forma concomitante. Com esse objetivo, utilizaram-se 39 ratos Wistar, machos, de aproximadamente 250g. Foram realizadas quatro feridas cirúrgicas padronizadas na região calvária dos animais. As lesões receberam os seguintes tratamentos: Coágulo (controle, Grupo A); LBI (Grupo B); associação da quitosana com a LBI (Grupo C) e quitosana (Grupo D). Os animais foram sacrificados nos tempos 1, 3 e 7 dias. As peças cirúrgicas foram removidas e submetidas à análise histológica para avaliação da reação inflamatória e de reparo dos tecidos na área da ferida cirúrgica. A utilização da biomembrana de quitosana junto com a LBI não acelerou o processo de reparo inflamatório inicial. A LBI reduziu o infiltrado inflamatório bem como a extensão da necrose, favorecendo a cicatrização da ferida. A quitosana estimulou a neoangiogênese e reduziu a extensão da necrose.

Palavras-chave: lasers, cicatrização, curativos.

ABSTRACT

Trevizam, NC. Action of laser and chitosan membrane on tissue repair in rats. Campo Grande, 2017. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The success of any surgical procedure depends on a good healing. To optimize this process, there are studies in the literature that demonstrate the efficacy of chitosan biomembrane and low intensity laser therapy (LLLT), used separately. However, there are no published studies that have evaluated their effectiveness when used concomitantly. For this purpose, 39 Wistar rats, males, with approximately 250g were used. Four standard surgical wounds were made in the calvaria of animals. Injuries received the following treatments: Clot (control, Group A); LLT (Group B); association of chitosan with LLT (Group C) and chitosan (Group D). The animals were sacrificed at days 1, 3 and 7. The specimens were removed and subjected to histological analysis to evaluate assessment of inflammatory reaction and tissue repair in the area of the surgical wound. The use of the chitosan biomembrane together with LLT did not accelerate the initial inflammatory repair process. LLT reduced the inflammatory infiltrate as well as the extent of necrosis, favoring wound healing. Chitosan stimulated neoangiogenesis and reduced the extent of necrosis.

Key words: lasers, wound healing, dressings.

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
J	joule
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
nm	nanômetro
mW	milliwatts
cm ³	centímetro cúbico
mg/kg	miligrama por quilo
mL	mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesões realizadas na região calvária dos animais.....	30
Figura 2 - Biomembrana de quitosana.....	30
Figura 3 - Aplicação de cianocrilato nas bordas da quitosana.....	31
Figura 4 - Remoção do tecido contendo as lesões	31
Figura 5 - Fotomicrografia referente ao grupo C (aumento de 400x). Tecido de granulação imaturo, extenso edema e rara neoangiogênese.....	34
Figura 6 - Fotomicrografia referente ao grupo C (aumento de 40x). Área de necrose (seta).....	35
Figura 7 – Figura gráfica referente à Mediana dos escores atribuídos à intensidade do infiltrado inflamatório.....	36
Figura 8 – Figura gráfica referente à Mediana dos escores atribuídos à necrose.....	37
Figura 9 - Figura gráfica referente à Mediana dos escores atribuídos à neoangiogênese.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores utilizados para infiltrado inflamatório, de acordo com a sua intensidade e extensão, para os animais sacrificados com um dia de pós-operatório..... 32

Tabela 2 - Escores utilizados para infiltrado inflamatório, quantidade de vasos neoformados e extensão da necrose, para os animais sacrificados com 3 e 7 dias de pós-operatório..... 33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Cicatrização.....	14
2.2 Laserterapia de baixa intensidade.....	16
2.3 Curativos	23
2.3.1 Quitosana	24
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Seleção dos animais	29
4.2 Cirurgia.....	29
4.3 - Histológico.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Análise histológica.....	34
5.2 Análise estatística	35
5.2.3 Infiltrado inflamatório	35
5.2.4 Necrose	37
5.2.5 Vasos	38
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9 ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

Para que se tenha sucesso em qualquer tratamento cirúrgico é de suma importância que ocorra corretamente o processo de cicatrização da ferida. A cicatrização é um mecanismo complexo, que envolve atividade celular quimiotática, com liberação de mediadores químicos e respostas vasculares (VIDAL-RAMOS et al., 2014).

Os locais de reparação variam na quantidade de destruição tissular local; por exemplo, uma incisão cirúrgica deixa pouco ou nenhum tecido desvitalizado; por outro lado, uma necrose irregular e disseminada faz com que a inflamação aguda tenha que persistir para liquefazer o tecido necrótico, assim, o reparo não pode progredir até que as estruturas necróticas sejam removidas: quanto mais tempo persiste o processo inflamatório, mais tempo leva a cura tecidual levando à reparação por fibrose (RUH et al., 2013).

Algumas técnicas estão sendo utilizadas na clínica odontológica para que ocorra o aceleração do processo de cicatrização, sendo a laserterapia de baixa intensidade (LBI) uma delas. A LBI teve início na década de 1970, após relatos de resultados positivos da irradiação em culturas de células e experimentos em animais (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Usado na periodontia desde a década de 80, a LBI é empregada principalmente com fins terapêuticos, pelas suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação tecidual. É uma técnica não invasiva que atua na redução dos níveis locais de prostaglandina, propicia proliferação celular e síntese de colágeno, além de estimular a liberação de adenosina trifosfato (ATP) celular e a liberação de fatores de crescimento (BARROS et al., 2008).

O laser de luz visível é utilizado em lesões epiteliais superficiais por interação específica com os cromóforos. A utilização em diferentes comprimentos de onda é capaz de acelerar a formação da epiderme; aumentar a espessura da camada epitelial; promover neovascularização e reorganizar as fibras colágenas (FREITAS et al., 2013).

Outro método utilizado para estimular a cicatrização tecidual é através do uso da biomembrana de quitosana. A partir da desacetilação da quitina, há a formação da quitosana, que apresenta estrutura primária idêntica à quitina, porém, há uma

predominância das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (50-60%) (CAMPANA FILHO et al., 2007).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose. A molécula de quitosana, derivada da quitina, foi descoberta a cerca de 150 anos e apresenta como propriedades biológicas: atividade antimicrobiana; efeito analgésico; capacidade de acelerar o processo de cicatrização tecidual e tem efeito coagulante (SILVA et al., 2006).

Para Kyzas e Bikiaris (2015) a quitosana é um material promissor, não só devido às suas propriedades físicas (estrutura macromolecular, não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, etc.) e pela sua aplicabilidade em diferentes áreas, mas também pelo seu potencial de adsorção (adesão de moléculas de um fluido a uma superfície sólida).

HemCon Dental Dressing é um curativo epitelial à base de quitosana. Facilita a hemostasia precoce, reduz a dor pós-operatória e mantém o leito da ferida protegido de infecções, devido às suas propriedades antimicrobianas (KUMAR et al., 2016).

Diante da comprovação literária da eficácia cicatricial do uso da LBI e da biomembrana de quitosana, separadamente, este trabalho tem como objetivo avaliar, histologicamente, o processo inflamatório inicial dos tecidos submetidos às duas técnicas aplicadas de forma concomitante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cicatrização

Segundo Mandebaum et al. (2003) as grandes mudanças ocorridas nas últimas décadas, nos conceitos referentes à cicatrização, têm mobilizado as indústrias a desenvolver e colocar no mercado produtos cada dia mais específicos, que sejam eficazes e adequados para cada tipo de ferida em termos de custo/benefício. Além do tipo de curativo, fatores gerais e locais podem interferir no processo de cicatrização. Dos fatores gerais, interfere a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas. Dos fatores locais, interfere a técnica cirúrgica, formação de hematomas, infecção, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização.

Balbino et al. (2005) realizaram uma revisão de literatura sobre os mecanismos envolvidos na cicatrização. Segundo os autores, quase concomitante ao estímulo lesivo, sob a ação de descargas adrenérgicas e mediadores químicos locais, ocorre vasoconstrição como primeira resposta. Posteriormente, com a agregação plaquetária, dá-se o tamponamento dos vasos sanguíneos; influxo de neutrófilos e macrófagos, com consequente aumento da concentração de ácido láctico e queda do pH, que, aliados à hipóxia, ativam os macrófagos para a produção de fatores de crescimento. Em seguida, a ativação de fibroblastos se intensifica, dando início a formação do tecido de granulação e de novos capilares, restabelecendo o fluxo sanguíneo. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa dar a ferida um aspecto de cicatriz. Entre os mediadores envolvidos, a IL-6 é considerada fundamental em diversas etapas da inflamação, já que possui efeitos quimioatrativos para neutrófilos. Já a IL-10 é importante na finalização da resposta inflamatória, inibindo a infiltração de neutrófilos e macrófagos aos sítios de injúria tissular.

Uma das formas de se avaliar o processo de reparação é através da técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), utilizando alguns indicadores, tais como:

exsudato neutrofílico, edema intersticial, congestão vascular, neoformação vascular, deposição de fibrina, entre outros (CAMPOS et al., 2007).

A cicatrização é dividida, didaticamente, em três fases distintas, complexas e sobrepostas. A primeira fase, chamada inflamatória, dura em média três dias e tem início no momento da lesão. Há formação de coágulo com o objetivo de proteger a região contra contaminações; ocorre fagocitose de corpos estranhos e ativação dos elementos celulares das fases subsequentes. Na segunda fase, a proliferativa, ocorre formação do tecido de granulação; tem início no terceiro dia da lesão e dura, em média, de duas a três semanas. Essa fase tem como características principais a neoangiogênese, a fibroplasia, a epitelização e deposição de matriz extracelular. A última fase, denominada de maturação ou remodelagem, tem início após a terceira semana e perdura por toda a vida da ferida. É caracterizada por um aumento substancial da resistência da ferida, porém, sem aumento da quantidade de colágeno (TAZIMA et al., 2008).

Mais tardiamente, na fase de remodelagem, os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil responsivo aos agonistas que estimulam o músculo liso, promovendo a contração da ferida. Com o decorrer do processo, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparece do local da ferida mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular. Esse fato leva à formação de cicatriz com reduzido número de células. Porém, se a presença de células persistir, formar-se-á um quelóide ou uma cicatriz hipertrófica na região (MENDONÇA e COUTINHO-NETO, 2009).

Sabe-se que as dificuldades no processo de reparo tecidual ocorrem nos estágios iniciais, nos quais se observa uma acentuação do edema, uma diminuída proliferação vascular e uma redução significativa de elementos celulares como leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Por isso, sugere-se que a instituição de uma intervenção é mais apropriada na fase inicial do processo de reparo tecidual. As complicações cicatriciais vão além do componente estético, promovem retrações teciduais, diminuição do movimento, dor, alteração de postura e, por fim, redução na qualidade de vida (LEAL et al., 2012).

As feridas cutâneas constituem um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estima-se que as dificuldades de cicatrização atinjam 1-2% da população em geral destinando, assim, 2% do orçamento em saúde é destinado ao tratamento de feridas. Em virtude da significância clínica e sócio-econômica das feridas cutâneas,

soluções inovadoras para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por deficiências no processo de reparação tecidual têm sido investigadas, incluindo o uso de células-tronco, fatores de crescimento, medicamentos, oxigenação hiperbárica e a utilização de recursos da Fisioterapia, tais como o ultrassom e, mais recentemente, a fototerapia (PAULA, 2016).

2.2 Laserterapia de baixa intensidade

Pugliese et al. (2003) realizaram um estudo para verificar a interferência do laser de baixa intensidade em relação às fibras colágenas e elásticas em ratos Wistar, submetidos a ferida no dorso e divididos em três grupos. No grupo 1 os animais não receberam aplicação de laser. No grupo 2 receberam emissão de laser de arseneto de gálio-alumínio 670nm, 9mW, 4J/cm² e no grupo 3 os animais também receberam emissão de laser de arseneto de gálio-alumínio, porém com 8J/cm². O laser foi aplicado pontualmente, em contato com a ferida e em uma única aplicação, logo após o ato cirúrgico. Os animais foram sacrificados nos dias 1, 2, 3, 5, 7 e 14. As peças foram removidas e analisadas histologicamente. Nos animais dos grupos submetidos à LBI observou-se que as alterações inflamatórias foram mais discretas. Estatisticamente, não houve diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle. Os animais que receberam uma densidade de energia de 4J/cm² mostraram um quadro histológico mais favorável do que a do grupo tratado com 8J/cm².

De acordo com Neves et al. (2005), a luz laser oferece uma relevante segurança ao ser utilizada, e difere das outras formas de luz devido principalmente a três características: a monocromaticidade (a luz laser é composta de fótons, todos da mesma cor e com o mesmo comprimento de onda. É, portanto, uma luz pura. Essa característica é importante devido à absorção seletiva do tecido humano); a coerência (as ondas são ordenadas em relação ao tempo e suas amplitudes são iguais); a unidirecionalidade ou colimação (o feixe de fótons é paralelo ao eixo do tubo que produz este tipo de energia e, com isso, toda a energia do laser concentra-se precisamente em um ponto focal).

Entre os mais utilizados para cicatrização estão o de HeNe (hélio-neônio), AsGa (arseneto de gálio) e AsGaAl (arseneto de gálio e alumínio). Os lasers infravermelhos são

considerados mais eficazes para analgesia e os do espectro vermelho, para cicatrização. Seus efeitos primários são bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. A LBI não causa lise celular; atua pelo aumento do metabolismo, proliferação e maturação celular, aumento da quantidade de tecido de granulação e diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização. Silva et al., em 2007, estudaram a cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo associados a quatro diferentes parâmetros de laserterapia, em ratos Wistar. A alteração epitelial mais marcante, principalmente após 14 dias do ato cirúrgico, foi a vacuolização de células epiteliais, seguida de mitoses atípicas e apoptose, levando à atrofia tecidual. Isso indica que, quanto mais irradiadas forem as células, maiores serão o metabolismo e a renovação tecidual. Portanto, sugere-se que a laserterapia não seja aplicada após o tempo fisiológico de cicatrização.

A LBI é amplamente utilizada devido aos efeitos benéficos que promove e à sua vasta aplicabilidade, porém, a falta de padronização nas metodologias dos estudos faz com que os resultados encontrados na literatura sejam bastante divergentes. A utilização correta da dose, do comprimento de onda da luz e da densidade de energia aplicada no tecido são importantes para alcançar o resultado pretendido. A LBI não tem efeitos carcinogênicos evidenciados, porém, dependendo dos parâmetros da luz e da taxa de proliferação da célula irradiada, pode haver um aceleração indireto e mutações adicionais no processo natural da carcinogênese (HENRIQUES et al., 2010).

A palavra laser corresponde a um acrônimo composto pelas primeiras letras de *light amplification by stimulated emission of radiation*, a qual significa: amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. A LBI atua na proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica; no aumento da síntese colagênica; na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos; no movimento celular dos leucócitos, fibroblastos e células epiteliais e no aumento da atividade fagocitária dos macrófagos. Como efeitos vasculares, há estimulação da angiogênese e vasodilatação, que são importantes na aceleração do processo de reparo do tecido injuriado (LINS et al., 2010).

Da Silva et al., em 2010, analisaram os efeitos microscópicos da LBI na cicatrização de lesões cutâneas em ratos Wistar e compararam os efeitos entre duas doses de energia: 2J/cm² e 4J/cm² (essas doses apresentaram, segundo os autores, efeitos analgésicos e cicatrizadores). O uso de animais para o experimento foi justificado

pelo objetivo de padronizar algumas características das lesões, como área, profundidade e localização, características estas difíceis de encontrar em um modelo experimental humano. Optou-se por realizar a lesão na região cérvico-dorsal, por ser uma área de difícil acesso ao animal, dificultando o auto ferimento. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos, notou-se que o grupo tratado com $4\text{J}/\text{cm}^2$ teve melhor processo de reparo tecidual.

Cavalcanti et al. (2011) realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de mostrar a relevância do conhecimento das propriedades físicas do laser e sua interação com os tecidos biológicos. Segundo os autores, essa interação depende de fatores relacionados às propriedades do laser, como comprimento de onda; quantidade de energia aplicada; potência; área focalizada e tempo de exposição, e também de fatores ligados ao tecido, como índice de refração; tipo de célula; perfusão sanguínea; condução térmica; oxigenação; inflamação; infecção ou necrose. A quantidade de cromóforos presente no tecido e sua correspondência entre o comprimento de onda utilizado e as características de absorção daquele cromóforo também interferem na absorção da luz do laser. Concluiu-se que, embora vários trabalhos tenham comprovado a eficácia do laser em diversos tratamentos, ainda não há uma padronização do seu uso. Doses muito baixas ou muito altas, tempo insuficiente de aplicação, entre outros, podem levar a resultados clínicos insatisfatórios.

A magnitude do efeito sobre a proliferação celular depende do estado fisiológico da célula no momento da irradiação: se as células são totalmente funcionais, ou crescendo num ambiente rico em soro, então não há nada para a LBI estimular e nenhum benefício terapêutico será observado. Outros fatores como tipo de cultura celular, tipo de célula, densidade de energia e tempo de aplicação também interferem nos resultados obtidos. Os autores sugeriram que um valor de densidade de energia de $0,5$ a $4\text{J}/\text{cm}^2$, e de um espectro visível entre 600 a 700nm são muito úteis para melhorar a taxa de proliferação de várias linhas de células; contribuindo para a regeneração tecidual, entretanto, se for aplicada uma quantidade insuficiente de energia, não haverá nenhuma resposta celular (ALGHAMADI et al., 2012).

Leal et al. (2012) realizaram uma revisão sistemática da literatura com o objetivo de verificar a efetividade do laser HeNe, comparado ao controle sem intervenção, na cicatrização de feridas em ratos. O laser hélio-neônio (HeNe), cujo comprimento de onda

é de 632,8 nm, atinge somente as estruturas superficiais e é o mais indicado para lesões estéticas ou em processo de cicatrização. Os autores constataram que não houve uma homogeneidade quanto à quantidade de grupos experimentais, bem como no número de animais por grupo. Principalmente, não houve unanimidade em relação aos parâmetros empregados em relação à frequência de aplicação, dose e tempo para a realização da análise histológica. O tempo de aplicação por ponto da ferida oscilou entre 12 segundos e três minutos e alguns autores sugerem que os valores de densidade de energia utilizados para cicatrização de feridas devem variar entre 3 e 6 J/cm².

Boras et al. (2013) realizaram uma revisão de literatura sobre as aplicações da LBI. Segundo os autores, há uma ação analgésica, pois a LBI melhora a liberação de endorfina e estimula a microcirculação, alterando a pressão hidrostática capilar que, por sua vez, resulta na absorção de edema e na eliminação de metabólitos. Quanto às contraindicações, em pacientes com distúrbios de coagulação a LBI deve ser evitada, pois interfere na circulação sanguínea de forma ainda desconhecida. Na presença de lesões pré-cancerosas e em pacientes gestantes, seu uso também está contraindicado.

Núñez et al. (2013) realizaram uma pesquisa, com 36 ratos Wistar, de aproximadamente 300g, para avaliar se há diferença estatística, no processo de reparo, entre lesões irradiadas com uma única dose de aplicação de laser e lesões irradiadas com dose fracionada. No dorso de cada animal foram feitas duas queimaduras e os animais foram divididos em 2 grupos: um grupo que recebeu uma única aplicação, em contato com a ferida, logo após o ferimento cirúrgico (4J/ cm²) e um grupo que recebeu aplicação de 1J/ cm² por dia, durante quatro dias. Cada animal foi controle dele mesmo, devido à variabilidade individual de duração e qualidade de reparo. Segundo os autores, ambos os regimes de LBI aumentaram o influxo de neutrófilos e neoangiogênese, que otimizaram o processo de cicatrização. No que diz respeito à conformidade da terapia, bem como os custos envolvidos, uma única dose de aplicação pode ser mais interessante.

Andrade et al. (2014-a) realizaram uma revisão de literatura sobre os efeitos da LBI sobre feridas cutâneas e suas formas mais eficazes de aplicação. Segundo os autores, a terapia com laser tem o objetivo de melhorar a resolução dos processos inflamatórios; reduzir a dor e o edema por meio de efeitos sobre linfócitos, macrófagos e fibroblastos, além de diminuir a síntese de mediadores inflamatórios. Esses benefícios são

dependentes do protocolo de utilização do laser e também da área onde é aplicado: em regiões de tumores seu uso está contraindicado. Concluiu-se que a laserterapia contribui para a contração de feridas e que doses compreendidas entre 3-6J/cm² são mais eficazes na redução de áreas de feridas, enquanto doses acima de 10J/cm² estão associadas a efeitos deletérios.

Andrade et al. (2014-b) realizaram uma revisão de literatura sobre a LBI e o seu mecanismo de ação. O laser de baixa intensidade excita moléculas presentes na mitocôndria, como o citocromo c oxidase e o superóxido dismutase (NADH), responsáveis pela absorção da luz vermelha e infravermelha. Essas moléculas absorvem a luz e aceleram a transferência de elétrons na cadeia respiratória, aumentando a produção de trifosfato de adenosina (ATP), o que auxilia na proliferação celular. Além disso, inibe significativamente a síntese de Prostaglandina E₂, um estimulador da inflamação e reabsorção óssea; auxilia na formação de novos vasos e na produção de colágeno; favorecendo, assim, a reparação e cicatrização de feridas.

Moura et al. (2014) realizaram uma revisão sistemática da literatura para avaliar os efeitos cicatrizantes do LED e da Quitosana de forma isolada e associada. Pôde-se observar uma falta de padronização nos testes que comprovam a eficácia dos dois métodos de tratamento, tanto do LED quanto de compostos a base de quitosana. Porém, o estudo analisou quase dez anos de publicações e não encontrou artigos que abordassem o uso concomitante de quitosana e LED. É possível que a união dessas terapias possa permitir um tempo ainda mais curto de tratamento, favorecendo a condição clínica do paciente, bem como o sucesso do tratamento.

Parâmetros como o tipo e fonte de emissão de luz laser, número de aplicações, duração do tratamento e mecanismo de ação que o laser exerce seus efeitos continuam a ser objeto de estudo de muitos trabalhos científicos. Novaes et al. (2014) avaliaram a influência que a fotobioestimulação, aplicada com diferentes densidades de energia (3 J/cm² e 30 J/cm²) tem na cicatrização por segunda intenção, em ratos Wistar. Os resultados deste estudo mostraram que ambos os grupos que receberam a irradiação com laser tiveram um teor de colágeno e de glicosaminoglicanos total mais elevado que no grupo controle. Além disso, os grupos tratados com laser também tiveram uma maior área de neovascularização, com melhores resultados no grupo que recebeu a densidade

de energia mais alta, o que conferiu também uma progressão mais rápida de fechamento da ferida em comparação com outros grupos.

Os lasers podem ser de baixa potência ou terapêuticos e de alta potência (lasers cirúrgicos). Lasers terapêuticos estão dentro do espectro eletromagnético da faixa vermelha até infravermelha, compreendendo comprimentos de onda que vão de 330 a 1100nm, sendo que, especificamente, os lasers da faixa vermelha correspondem aos comprimentos de onda de 632 a 780nm (ANTUNES et al., 2015).

Calisto et al. (2015) avaliaram os aspectos morfológicos da cicatrização de feridas traumáticas, em ratos Wistar, usando laser de baixa potência. Após a realização das feridas, os animais receberam irradiação com laser (660nm, 100mW, 10J/cm², 20s). Foram analisados, histologicamente, os parâmetros: reepitelização, intensidade de infiltrado inflamatório, presença de tecido de granulação e neoangiogênese. As pontuações foram estabelecidas através de um score: (1) = menos de 10%; (2) = entre 10 e 50%; (3) = mais do que 50%. A análise histológica revelou um aumento de reepitelização nos animais que receberam laser. Esse achado é importante porque a barreira epitelial impede a instalação de processos infecciosos, que constituem uma das complicações mais comuns em feridas.

De Loura Santana et al., em 2015, investigaram os efeitos que uma única, ou múltiplas, doses de irradiação com laser de baixa intensidade tem sobre a cicatrização de feridas, o tipo de infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno em 90 ratos Wistar diabéticos, de aproximadamente 250g. Realizou-se uma ferida cirúrgica no dorso dos animais, que foram subdivididos em 3 grupos: um grupo controle; um grupo que recebeu 4 aplicações de laser (1J/cm² por 4s) e um grupo que recebeu uma única dose de irradiação (4J/cm² por 104s). As peças cirúrgicas foram removidas e analisadas histologicamente. Independente da dose de energia empregada, a laserterapia contribuiu para o fechamento das feridas em aproximadamente 40% nos 3 primeiros dias, em comparação com o grupo controle, sendo que as lesões se apresentaram significativamente menores no grupo que recebeu irradiação. Entretanto, essa taxa foi semelhante em todos os grupos a partir do 8º dia. Ao final de 22 dias, nenhuma ferida cicatrizou antes. Conclui-se que a laserterapia não acelerou o processo de cicatrização, mas modulou a fase inflamatória, o que pôde diminuir o risco de infecção dos animais.

Martins et al. (2015) realizaram uma pesquisa em ratos para avaliar o efeito do laser de baixa intensidade associado ou não à um curativo hidrocolóide, na cicatrização de feridas cirúrgicas. Quarenta animais foram divididos em 4 grupos: um grupo recebeu aplicação única diária de laser (2J); um grupo teve o ferimento recoberto com o hidrocolóide; um grupo recebeu aplicação de laser e recobrimento com hidrocolóide; e um grupo controle. No grupo que recebeu hidrocolóide, os curativos foram trocados a cada 12 horas, o que interferiu na cicatrização dos limites da ferida, conferindo maior diâmetro. Os animais foram sacrificados com 3 e 7 dias e as peças analisadas histologicamente. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os três grupos em relação ao processo inflamatório agudo. No entanto, no sétimo dia, os grupos laser e hidrocolóide apresentaram processo inflamatório crônico, enquanto o grupo controle e o grupo que recebeu laser associado ao hidrocolóide ainda apresentava processo inflamatório agudo. Embora não tenha sido demonstrada ação anti-inflamatória no grupo laser, observou-se que esses animais mantiveram-se mais calmos, sugerindo um efeito analgésico da terapia. Observou-se, também, que o curativo de hidrocolóide propiciou um ambiente úmido e favorável para a cicatrização da ferida.

De Souza e Da Silva (2016) realizaram uma revisão sistemática da literatura, utilizando trabalhos experimentais acerca dos mecanismos de ação da LBI. Embora haja uma recomendação da associação mundial para terapia com laser sobre a dose de energia adequada para cada comprimento de onda, foi possível perceber uma importante variabilidade nas doses utilizadas. Isso ocorre porque ainda existem dúvidas sobre a dose e o comprimento de onda ideal. As doses de energia mais comumente utilizadas foram de 3J (26,66%). Comprimentos de onda na faixa de 600 a 700nm são indicados para o tratamento de tecidos localizados mais superficialmente, enquanto os comprimentos de onda entre 780 a 950nm são mais indicados nas lesões que atingem estruturas mais profundas, devido ao maior poder de penetração. Por outro lado, comprimentos entre 700 e 770nm não possuem uma atividade adequada. Quanto ao objeto de estudo, os ratos são considerados excelentes modelos experimentais para a espécie humana, devido a sua semelhança anatômica e fisiológica. Essa similaridade possibilita que as informações obtidas em pesquisas envolvendo diferentes tecidos e órgãos, possam ser utilizadas para o tratamento de injúrias que afetam o homem.

2.3 Curativos

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com a sua origem, sendo biológicos (autógenos – paciente; alógenos – doador humano; ou xenógenos - doador animal) ou sintéticos/aloplásticos (metais, cerâmicos e polímeros), ou através da resposta induzida ao meio biológico (bioinertes, bioabsorvíveis e bioativos). Para desempenhar a função desejada e estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos por meio de reparo histológico, como aqueles usados na cicatrização de feridas, os biomateriais devem apresentar um conjunto satisfatório de propriedades físicas, químicas e biológicas (SINHORETI et al., 2013).

Curativos epiteliais devem manter um ambiente úmido na interface da ferida; permitir troca gasosa; atuar como uma barreira para os microorganismos e remover o excesso de exsudato. Devem, também, ser não tóxicos, não alergênicos e serem facilmente removíveis sem causar trauma. Os curativos na forma de adesivos estão ganhando popularidade em diversas aplicações clínicas, incluindo a cicatrização de feridas, engenharia dos tecidos e aplicações odontológicas. Dentro desse grupo de curativos, a literatura tem mostrado que a quitosana e seus derivados possuem grande potencial para acelerar a cicatrização de feridas (AZUMA et al., 2015).

Pires et al. (2015) realizaram uma revisão de literatura sobre tipos de biomateriais, suas aplicações e propriedades. Segundo os autores, biomateriais são dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, na forma de sólidos, géis, pastas ou mesmo líquidos. Como propriedades biológicas, destacam-se: biocompatibilidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas, como rugosidade, porosidade, permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade e propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo.

2.3.1 Quitosana

Em 2007, Azevedo et al. realizaram uma revisão de literatura sobre conceitos, estrutura, propriedades e aplicações da quitosana. A quitosana é um polímero obtido através da desacetilação da quitina; é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável. Constatou-se que, além da sua ampla aplicabilidade, a quitosana pode atuar na prevenção da formação do biofilme de microorganismos (crescimento de fungos e bactérias), uma vez que destrói os micróbios, essencialmente pela imobilização ou fixação dos mesmos, evitando que os microorganismos se agrupem, o que diminui a chance de infecção local.

O uso da quitosana abrange diversas áreas como as indústrias farmacêuticas, Medicina e a Odontologia. A quitosana pode ser utilizada para regeneração da pele, do tecido ósseo e cartilaginoso e é considerada aceleradora da reparação tecidual. Como vantagens apresenta o baixo custo, facilidade de obtenção, manipulação em diferentes formas (géis, membranas), biocompatibilidade e biodegradabilidade. A falta de consenso científico sobre o método de esterilização, o que é fundamental para o uso comercial e aplicabilidade, apresenta-se como desvantagem (SPIN-NETO et al., 2008).

Brito et al. (2009) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de membranas de quitosana. Foram utilizados 20 ratos wistar, machos, nos quais foram implantadas membranas de quitosana, na região mediana dorsal. Os animais foram divididos em quatro grupos e sacrificados em 7, 15, 30 e 60 dias (G1, G2, G3, G4, respectivamente). Após o sacrifício, foi retirada a membrana de quitosana, que seguiu para a confecção de lâminas histológicas. Conforme análise, no G1 observou-se presença de fibroblastos, angiogênese, fibras colágenas e pequena quantidade de células inflamatórias. No G2 houve aumento dos fibroblastos jovens e das células inflamatórias. No G3 houve predomínio de linfócitos, monócitos, neutrófilos e células gigantes. Já no G4 ocorreu diminuição das células inflamatórias. Considerou-se que a membrana de quitosana é indutora de pouca reação inflamatória, do tipo crônica. Não houve sinais de rejeição, o que pode ser um indicativo favorável a seu uso como material para inclusões.

A obtenção da quitina e da quitosana ocorre em três etapas: desproteínização, desmineralização e despigmentação. Por utilizarem materiais mais baratos e não

necessariamente importados, apresenta baixo custo; tem abundante fonte de extração e baixa toxicidade (DIAS et al., 2013).

Em pH ácido, a quitosana é carregada positivamente e, portanto, é mais suscetível à interação com moléculas carregadas negativamente, como proteínas, polissacarídeos aniônicos e ácidos nucleicos, que geralmente estão presentes na pele. Apresenta capacidade de formação de película, características de gelificação, forte propriedade adesiva ao tecido da ferida e capacidade de absorção de exsudato (MOURA et al., 2013).

Segundo Tavaría et al. (2013) a quitosana é um polissacarídeo que apresenta estrutura química única, com elevada densidade de carga e de grupos reativos, assim como diversas ligações de hidrogênio. É encontrada de forma abundante na natureza como componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes, diatomáceas, algas e paredes celulares de alguns fungos. Na clínica odontológica, apresenta capacidade antioxidante, antimicrobiana; inibe a formação do biofilme, tem ação anti-inflamatória e cicatrizante.

Os polímeros de origem biológica são abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis. Assim, a quitosana vem sendo amplamente estudada por suas propícias interações específicas com componentes da matriz extracelular, o que tem levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia tecidual, como no reparo da pele, osso e cartilagens (PIRES et al., 2015).

O efeito antimicrobiano da quitosana tem sido associado aos grupos amino carregados positivamente (NH_3^+). Sugere-se que esses grupos participem de uma interação eletrostática com os grupos carregados negativamente na superfície bacteriana. Essa eficiência anti-biofilme varia para diferentes tipos de bactérias, conforme o peso molecular e desacetilação da quitosana (DRAGLAND et al., 2016).

2.3.1.1 HemCon Dental Dressing (HDD)

Apesar de décadas de avanços em antibióticos e anti-sépticos, infecções que se desenvolvem em feridas traumáticas e cirúrgicas continuam a ser um grande problema. O

aumento mundial de bactérias patogênicas resistentes a múltiplos fármacos tem levado a uma necessidade crescente de administração tópica de produtos anti-microbianos que possam ser aplicados em feridas contaminadas. Burkatovskaya et al. (2008) avaliaram o efeito de um curativo de quitosana (*HemCon Dental* - HDD) em feridas infectadas por *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, o curativo a base de quitosana acelerou o processo de cicatrização; isso porque a quitosana tem propriedades antibacterianas, mantém as bordas da ferida imóveis durante o tempo de aderência e reduz o infiltrado de células inflamatórias nos primeiros dias do processo de cicatrização.

Kale et al. (2012) avaliaram a eficácia da biomembrana de quitosana *HemCon Dental* (HDD) no controle de hemorragia pós-operatória e seu papel na cicatrização, comparando-a com a compressão com gaze seguida de sutura, em 40 pacientes que faziam uso oral de medicamentos antiplaquetários. Locais de extração similares e idênticos foram selecionados em cada paciente, onde de um lado a ferida foi coberta com HDD enquanto o outro lado foi submetido a uma compressão com gaze e, se necessário, sutura. Os pacientes foram orientados a não alterar o seu regime de administração do medicamento antiplaquetário durante a pesquisa e receberam avaliação de um cirurgião no 7º dia pós-operatório para avaliação da dor e da cicatrização. A dor pós-operatória foi registrada em scores numa escala de 0-10, relatada pelos próprios pacientes. A cicatrização foi avaliada com base em uma escala analógica visual, verificando presença de coágulo, secreção de pus, alveolite e extensão da abertura da ferida em um escore de 1 a 3. Após análise estatística dos escores, os autores verificaram que a pontuação média de dor no local que recebeu HDD foi consideravelmente menor do que no local de controle. O tempo para a homeostasia foi menor quando se utilizou HDD e a cicatrização pós-operatória com mínimo de complicações também foi observada neste grupo. De acordo com os autores, isto pode ser atribuído às propriedades antibacterianas da quitosana, que proporciona uma barreira contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e negativas. Além disso, a atração eletrostática da HDD com os glóbulos vermelhos forma uma massa viscosa densa que proporciona aderência e também se adapta às irregularidades do osso alveolar, eliminando ou minimizando o risco de tromboembolismo, permitindo que o paciente continue tomando os seus medicamentos antiplaquetários e, ainda, tenha benefícios na cicatrização.

HDD é um curativo epitelial à base de polissacarídeo biocompatível, derivado de exoesqueleto de mariscos. Normalmente, o curativo é reabsorvido num período de 48 horas, deixando o processo de cicatrização ocorra naturalmente. Facilita a hemostasia precoce, reduz a dor pós-operatória e mantém o leito da ferida protegido de infecções, devido às suas propriedades antimicrobianas (KUMAR et al., 2016).

3 OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Avaliar o processo inflamatório inicial na região calvária de ratos.

b. Objetivo específico

Avaliar, histologicamente, o processo inflamatório inicial (infiltrado inflamatório, quantidade de vasos neoformados e presença de necrose) dos tecidos submetidos ao uso de quitosana e LBI.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Utilizou-se 39 ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) adultos jovens, machos, com peso de aproximadamente 250g, de procedência do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande - MS). Os animais foram mantidos em gaiolas unitárias de 25cm³, possibilitando espaço suficiente para sua movimentação e descanso, sob temperatura ambiente, iluminação e higiene controlada; alimentados com ração balanceada Nuvilab CR - 1[®] (Curitiba - PR, Brasil) e água à vontade durante todo o experimento. Os animais permaneceram isolados, para certificar que ficariam estáveis e saudáveis, mantendo contato apenas com as pessoas envolvidas no trabalho.

4.2 Cirurgia

Os procedimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMS; protocolo nº 746/2016 (em anexo).

Para a aplicação de anestésicos e medicação pós-operatória, os animais foram pesados e suas doses individualizadas. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg). Foi feita tricotomia de toda a calvária e em seguida a antisepsia com gluconato de clorexidina a 2% da região.

Na região calvária de cada rato foram realizadas quatro feridas cirúrgicas padronizadas de 5mm de diâmetro, determinado pelo bisturi circular, e profundidade de 2 mm, estabelecida por um elástico ortodôntico. Para controle do torque, foi utilizado um contra-ângulo cirúrgico com redução 20:1 a 400rpm. Em cada lesão foi aplicado um tratamento, conforme especificação a seguir (Figura 1):

- 1.Lesão superior direita: Grupo controle - coágulo (Grupo A).
- 2.Lesão superior esquerda: Aplicação do LBI (Grupo B).

3. Lesão inferior esquerda: LBI + Biomembrana de quitosana (HemCon) (Grupo C).
4. Lesão inferior direita: Biomembrana de quitosana (HemCon) (Grupo D).

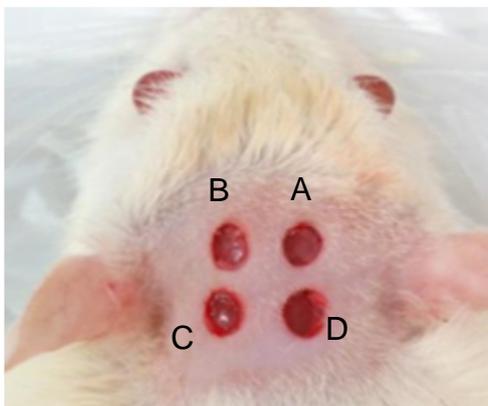


Figura 1 – Feridas cirúrgicas realizadas na calvária do animal.

O bisturi cirúrgico foi pressionado sobre a quitosana que, então, foi recortada com uma margem de segurança (figura 2) e fixada nas feridas através da aplicação de cianoacrilato (SuperBonder®, Itapevi - SP, Brasil) com cavibrush (FGM, Joinville - SC, Brasil) em suas bordas (figura 3). As feridas que receberam quitosana, foram recobertas com micropore (3M, Sumaré – SP, Brasil) para que não houvesse deslocamento da mesma. O laser de baixa intensidade (MMO, Ribeirão Preto – SP, Brasil) foi aplicado logo após a cirurgia, em dose única, por 20s, com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 110mw e comprimento de onda de 660nm, antes do posicionamento do biomaterial, em contato com a ferida.



Figura 2 – Biomembrana de quitosana.



Figura 3 – aplicação de cianocrilato nas bordas da quitosana.

Aplicou-se uma dose de antimicrobiano de amplo espectro logo após o ato cirúrgico (Pentabiótico Veterinário Reforçado®, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge - Iowa, Estados Unidos), via parenteral, com posologia de 1 mL/kg e uma dose de analgésico butorfanol (Torbugesic®, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge - Iowa, Estados Unidos) na dosagem de 0,1ml/300 g.

Em um segundo tempo cirúrgico (1 dia, 3 dias e 7 dias de pós-operatório), os animais foram anestesiados como na cirurgia em que foram feitas as lesões e todo o tecido contendo as lesões foi removido (Figura 4). Em seguida, os animais foram sacrificados em câmara de gás.

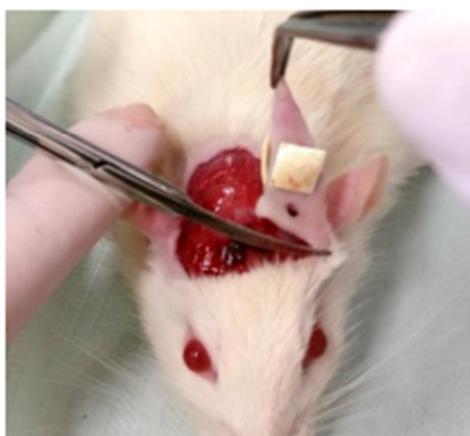


Figura 4: remoção do tecido contendo as lesões.

4.3 - Histológico

As amostras foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado. Posteriormente, foi realizado o processamento histológico com inclusão em parafina. Os cortes de 5 μ m foram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. Cada lâmina foi identificada com um número, equivalente ao animal, e uma letra, que identificava o tipo de tratamento que a amostra havia recebido.

A análise histológica foi feita através de estudo cego e considerou características da reação inflamatória e de reparo dos tecidos na área da ferida cirúrgica. Considerou-se: 1) infiltrado inflamatório; 2) quantidade de vasos neoformados; e 3) presença de necrose. Para as amostras coletadas dos animais sacrificados em 1 dia após o procedimento cirúrgico, foi avaliada intensidade e extensão do infiltrado inflamatório. Para as amostras coletadas dos animais que foram sacrificados com três e sete dias após o procedimento cirúrgico, foi possível avaliar intensidade e tipo do infiltrado (agudo, misto ou crônico). Para que se pudesse atribuir escores para os aspectos avaliados, o examinador, primeiro, comparou esses aspectos com aqueles das áreas adjacentes à ferida, consideradas “normais” e seguiu comparando as feridas entre as lâminas. Só era atribuído escore diferente quando a diferença era visivelmente constatada (REZENDE et al., 2007). Na tabela 1 é possível relacionar os scores aos seus significados qualitativos para as amostras com um dia de tratamento. Na tabela 2, as amostras com três e sete dias de tratamento.

Tabela 1 – Escores utilizados para infiltrado inflamatório, de acordo com a sua intensidade e extensão, para os animais sacrificados com um dia de pós-operatório.

Infiltrado Inflamatório			
Intensidade		Extensão	
1	Discreto	1	Até 1/3 superior da ferida
2	Moderado	2	Até o 1/3 médio da ferida
3	Intenso	3	Além do 1/3 médio da ferida

Tabela 2 – Escores utilizados para infiltrado inflamatório, quantidade de vasos neoformados e extensão da necrose, para os animais sacrificados com 3 e 7 dias de pós-operatório.

Infiltrado Inflamatório				Qde de vasos neoformados		Extensão da necrose	
Intensidade		Tipo					
1	discreto	A	Agudo	1	baixa	1	Até 1/3 superior da ferida
2	moderado	M	Misto	2	moderada	2	Até o 1/3 médio da ferida
3	intenso	C	Crônico	3	grande	3	Além do 1/3 médio da ferida

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

Nas amostras dos animais sacrificados com um dia de pós-operatório observou-se, independente do tratamento, a formação de tecido de granulação bastante imaturo, com presença de extensas áreas de edema, rara neoformação vascular e infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear (escore 2 para a maioria das feridas) em cuja maior parte das lesões atingiu os terços superior e médio (escores 1 e 2) do leito da ferida.

Nas amostras dos animais sacrificados com três dias de pós-operatório, o tecido de granulação mostrou moderado infiltrado inflamatório na maioria das lesões, com predominância do tipo agudo. Neste tempo de tratamento foi possível atribuir escores para vasos neoformados, sendo que a maior parte das lesões recebeu escore 1 ou 2. A necrose, observada em todas as amostras, se estendeu do terço superior até o terço médio, na maior parte das feridas (escores 1 ou 2).

A maioria das feridas com 7 dias de tratamento também mostrou moderada intensidade de infiltrado inflamatório, no entanto, predominou o tipo crônico. A maioria das feridas apresentou quantidade moderada de vasos neoformados (escore 2) e grande quantidade de fibroblastos (score 3) (figura 5). Com este tempo de tratamento algumas feridas não mais apresentavam necrose, porém a maioria mostrou necrose que se estendeu do terço superior até o terço médio (escores 1 ou 2) (Figura 6).

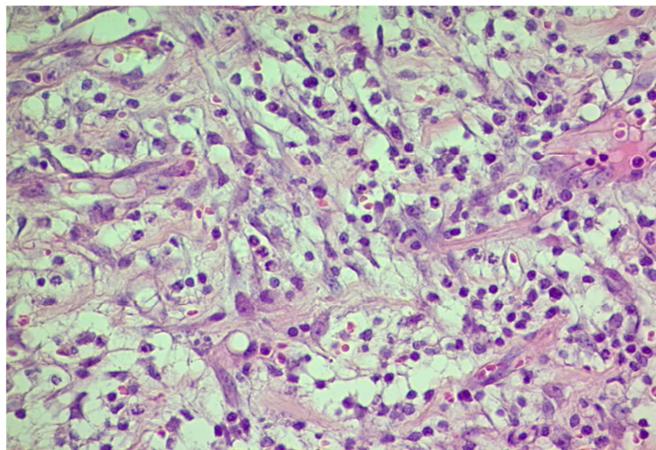


Figura 5 – Fotomicrografia referente ao grupo C (aumento de 400x), referente ao grupo C. Tecido de granulação imaturo, extenso edema e rara neoangiogênese.

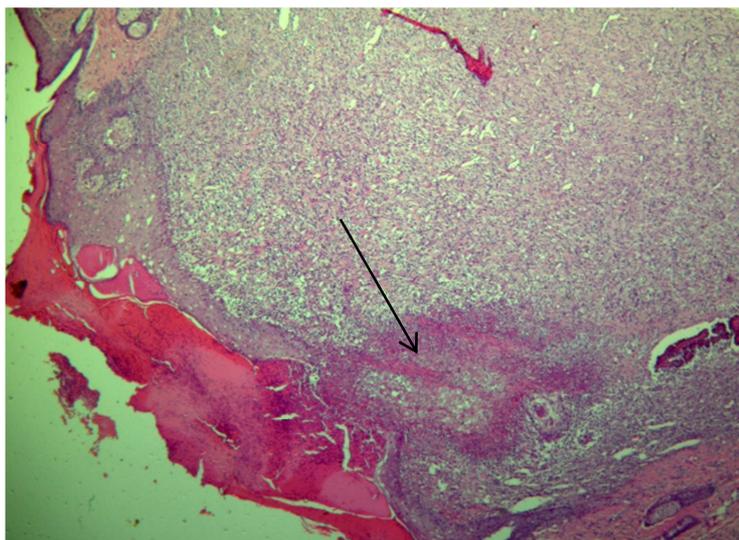


Figura 6 – Fotomicrografia referente ao grupo C (aumento de 40x). Área de necrose (seta).

5.2 Análise estatística

Trata-se de delineamento experimental contendo 4 grupos não-vinculados entre si, com variáveis dependentes (“intensidade do infiltrado inflamatório”, “extensão da necrose”, “vasos neoformados”), de natureza qualitativa ordinal e mensuradas em 3 tempos distintos. O tratamento estatístico exigiu a utilização de testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis ou teste de Mann-Whitney entre e intra grupos) e teste post hoc que permitiu comparações duas a duas entre grupos (Dunn), caso seja constatada significância estatística ($\alpha=0,05$).

O programa estatístico rodado foi o GraphPad Prism, versão 6.01.

5.2.3 Infiltrado inflamatório

A análise dos dados referentes à intensidade do infiltrado inflamatório nos diferentes tempos experimentais é apresentada na figura 7, sob forma gráfica.

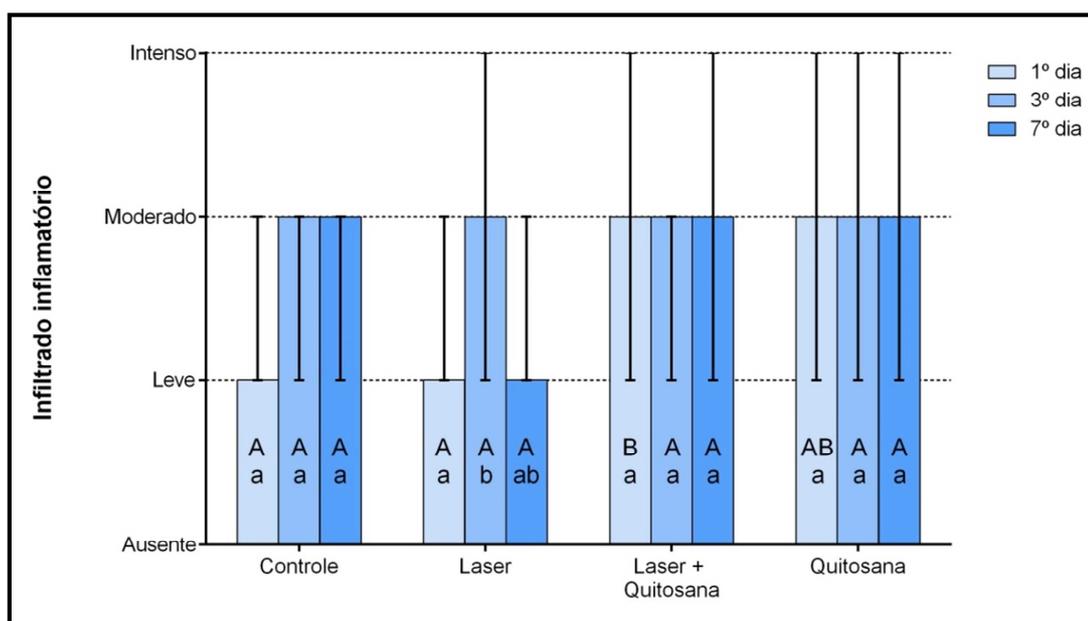


Figura 7 - Mediana dos escores atribuídos à intensidade do infiltrado inflamatório observada nos grupos testados, em diferentes tempos experimentais. A linha vertical representa a amplitude da amostra. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre tempos experimentais intragrupo.

O teste de Kruskal-Wallis aplicado aos diferentes tratamentos mostrou diferenças significantes apenas no primeiro dia de observação ($p = 0,012$). O teste complementar de Dunn revelou que estas diferenças limitavam-se ao grupo composto pelo laser + quitosana. O laser, quando utilizado sozinho, foi semelhante ao grupo controle, e a quitosana sozinha apresentou quantidades intermediárias de infiltrado inflamatório, sendo estatisticamente semelhante a todos os outros grupos.

O mesmo teste, aplicado aos diferentes dias de observação, revelou que havia diferenças intragrupo apenas no tratamento com laser (0,024). O teste de Dunn revelou que o infiltrado inflamatório mostrou-se mais intenso no 3º dia quando comparado ao 1º, diminuindo no 7º dia. Os outros tratamentos mostraram resultados semelhantes entre os tempos experimentais ($p > 0,05$).

5.2.4 Necrose

A análise dos dados referentes à necrose nos tempos experimentais de 3 e 7 dias é apresentada na Figura 8, sob forma gráfica.

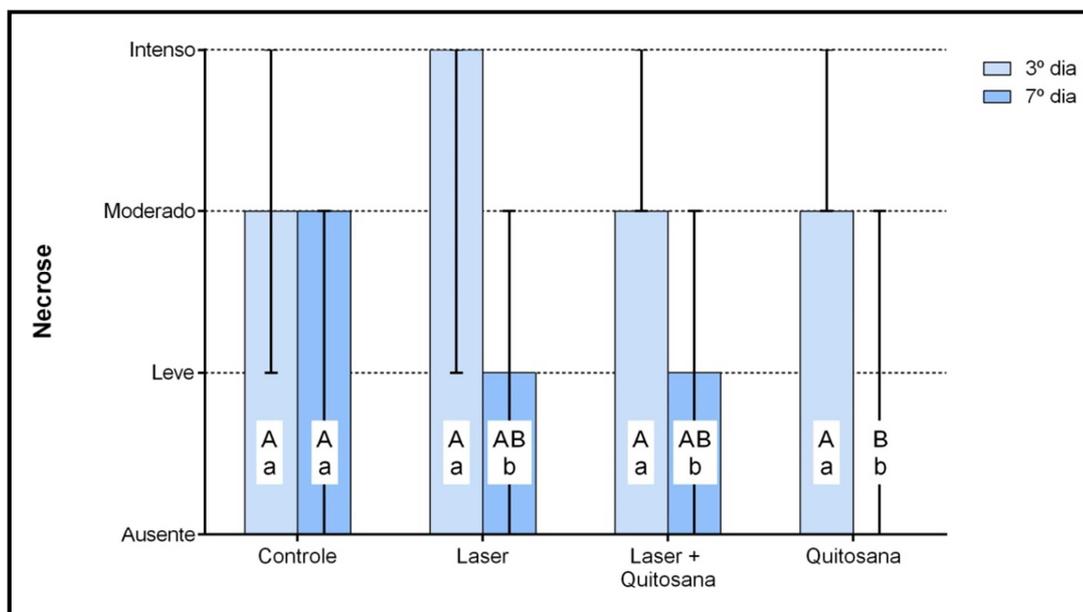


Figura 8 - Mediana dos escores atribuídos à necrose observada nos grupos testados, em diferentes tempos experimentais. A linha vertical representa a amplitude da amostra. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre grupos. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre tempos experimentais intragrupo.

O teste de Kruskal-Wallis aplicado aos diferentes tratamentos mostrou diferenças significantes apenas no sétimo dia de observação ($p = 0,011$). O teste complementar de Dunn revelou que estas diferenças limitavam-se ao grupo tratado com quitosana, sendo diferente do grupo controle. Os tratamentos com laser ou este associado à quitosana apresentaram resultados intermediários, sendo semelhantes tanto ao grupo controle quanto ao grupo tratado apenas com quitosana ($p > 0,05$).

O teste de Mann-Whitney, aplicado aos diferentes dias de observação, revelou que a intensidade da necrose observada no sétimo dia, nos grupos experimentais, foi menor do que no terceiro dia ($p < 0,05$), com exceção do grupo controle, que apresentou valores semelhantes para os dois tempos experimentais ($p > 0,05$).

5.2.5 Vasos

A análise dos dados referentes à angiogênese nos tempos experimentais de 3 e 7 dias é apresentada na Figura 9, sob forma gráfica.

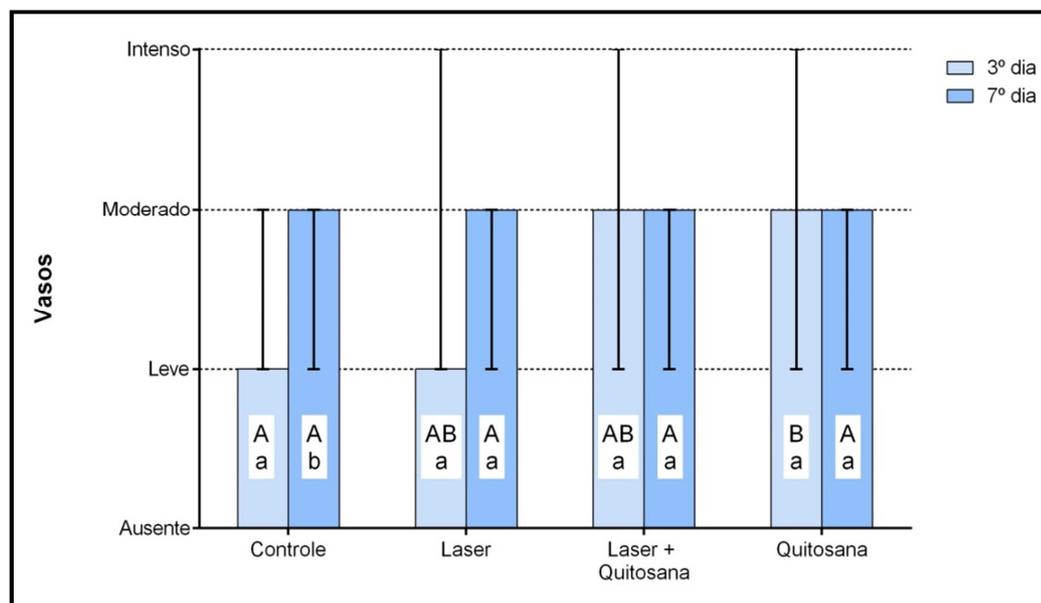


Figura 9 - Mediana dos escores atribuídos à angiogênese observada nos grupos testados, em diferentes tempos experimentais. A linha vertical representa a amplitude da amostra. Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre tempos experimentais intragrupo.

O teste de Kruskal-Wallis aplicado aos diferentes tratamentos mostrou diferenças significantes apenas no terceiro dia de observação ($p = 0,039$). O teste complementar de Dunn revelou que estas diferenças limitavam-se ao grupo tratado com quitosana, sendo diferente do grupo controle. Os tratamentos com laser ou este associado à quitosana apresentaram resultados intermediários, sendo semelhantes tanto ao grupo controle quanto ao grupo tratado apenas com quitosana ($p > 0,05$).

O teste de Mann-Whitney, aplicado aos diferentes dias de observação, revelou que a angiogênese observada no sétimo dia, no grupo controle, foi maior do que no terceiro dia ($p = 0,036$), com os outros grupos apresentando valores semelhantes para os dois tempos experimentais ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A cicatrização é um mecanismo complexo, que envolve atividade celular quimiotática e mediadores químicos. Didaticamente, é dividida em três fases: inflamação; formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação. Entretanto, essas fases ocorrem sobrepostas no tempo (BALBINO et al., 2005). Em virtude da complexidade do processo de reparo tecidual, inúmeros fatores exógenos e endógenos podem alterar os mecanismos de cicatrização da pele, resultando em disfunções na integridade cutânea, tais como a fibrose excessiva ou a persistência de feridas (PAULA, 2016). Além disso, o tipo de curativo e fatores gerais podem interferir no processo de cicatrização como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas (MANDEBAUM, 2003).

A LBI é amplamente utilizada devido aos efeitos benéficos que promove: proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica; aumento da síntese colagênica; diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos; movimento celular dos leucócitos, fibroblastos e células epiteliais e aumento da atividade fagocitária dos macrófagos. Como efeitos vasculares, há estimulação da angiogênese e vasodilatação, que são importantes na aceleração do processo de reparo do tecido injuriado (LINS et al. 2010); melhora a liberação de endorfina e estimula a microcirculação, alterando a pressão hidrostática capilar que, por sua vez, resulta na absorção de edema e na eliminação de metabólitos (BORAS et al., 2013).

A quitosana é um polímero obtido através da desacetilação da quitina; é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável (AZEVEDO et al., 2007; CAMPANA FILHO et al., 2007). Apresenta capacidade de formação de película, características de gelificação, forte propriedade adesiva ao tecido da ferida e capacidade de absorção de exsudato. Tem capacidade antioxidante, antimicrobiana; inibe a formação do biofilme, tem ação anti-inflamatória e cicatrizante (MOURA et al., 2013; TAZIMA et al., 2013).

Neste trabalho foram utilizados 39 ratos - *Rattus norvegicus albinos wistar* – (SILVA et al., 2007; BRITO et al., 2009; DA SILVA et al., 2010; PUGLIESE et al., 2013; NOVAES et al., 2014; CALISTO et al., 2015; DE LOURA SANTANA et al., 2015; MARTINS et al., 2015) de aproximadamente 250g (DE LOURA SANTANA et al., 2015). O uso de animais

para o experimento foi justificado pelo objetivo de padronizar algumas características das lesões, como área, profundidade e localização, características estas difíceis de encontrar em um modelo experimental humano. Optou-se por realizar a lesão na região cervico-dorsal, por ser uma área de difícil acesso ao animal, dificultando o auto ferimento (DA SILVA et al., 2010; DE LOURA SANTANA et al., 2015).

Entre os lasers mais utilizados para cicatrização de feridas, estão o de HeNe (hélio-neônio), AsGa (arseneto de gálio) e AsGaAl (arseneto de gálio e alumínio) (CAVALCANTI et al., 2011). Nesse trabalho, utilizamos o LBI de AsGaAl (PUGLIESE et al., 2003; SILVA et al., 2007), aplicado em contato com a ferida, logo após o ato cirúrgico (PUGLIESE et al., 2003). De acordo com Leal et al., 2012, os valores de densidade de energia utilizados para cicatrização de feridas devem variar entre 3 e 6 J/cm². Utilizamos a dose de 4J/cm², (PUGLIESE et al., 2003; DA SILVA et al., 2010; DE LOURA SANTANA, 2015), por 20 segundos (CALISTO et al., 2015). De Loura Santa et al., 2010, compararam a eficácia de aplicação do LBI em dose única ou fracionada e não encontraram diferença estatística significativa. Com base nisso, optamos pela aplicação do LBI em dose única, assim como Pugliese et al., 2003.

Nos animais que foram sacrificados com 1 dia de pós-operatório, observou-se que não houve diferença estatística no infiltrado inflamatório entre o grupo controle e os grupos que receberam laser e laser associado com quitosana. Todos os grupos apresentaram resposta inflamatória de moderada a intensa e presença de edema, corroborando com Calisto et al., em 2015 e com Pugliese et al., em 2003. Entretanto, houve diferença estatística significativa dentro do grupo que recebeu laser, com uma redução do infiltrado inflamatório no sétimo dia. Busnardo e Biondo-Simões (2010) também observaram diminuição do infiltrado inflamatório em ratos Wistar que receberam LBI, constatando a redução de infiltrado inflamatório no terceiro dia. Ao contrário de Novaes et al., em 2014, não obteve-se uma melhora estatisticamente significativa da neoangiogênese no grupo que recebeu LBI, nem no grupo que recebeu aplicação de laser associado com quitosana. Segundo o autor, uma dose mais alta de energia pode ter um efeito melhor nesse quesito. A falta de padronização da LBI faz com que diferentes resultados em relação ao reparo epitelial sejam encontrados na literatura (ROCHA JUNIOR et al., 2007; HENRIQUES et al., 2010; PIVA et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2014; ANDRADE et al., 2014).

Nas lesões em que foram aplicadas a biomembrana de quitosana da marca HemCon, houve uma rápida hemostasia logo após a cirurgia, assim como no trabalho de KALE et al., em 2012. Corroborando com Azuma et al., em 2015, observamos que a quitosana é um material biocompatível, visto que não observou-se rejeição em nenhuma animal, podendo ser considerada apropriada para uso como curativo biológico (SILVA et al., 2006). Martins et al. (2015) associaram a LBI com um hidrocolóide em lesões em ratos Wistar. No presente estudo, obteve-se diferença estatística significativa no aumento da neoangiogênese, no terceiro dia, e também houve uma diferença estatística significativa na redução da área de necrose, nos animais que foram sacrificados com 7 dias de pós-operatório, o que sugere que, assim como o hidrocolóide, a quitosana propiciou um ambiente úmido, favorecendo a evolução do processo cicatricial. A redução da extensão da área de necrose pode ser explicada pelas propriedades antibacterianas da biomembrana de quitosana, indo ao encontro do que foi afirmado por Burkatovskaya et al. (2008) e Silva et al., em 2008. Segundo esses autores, a quitosana de baixa massa molecular penetra em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos.

Fráguas et al. (2015) realizaram uma pesquisa para avaliar os efeitos cicatrizantes da quitosana em lesões cutâneas de ratos. Realizou-se uma lesão na região dorsal dos animais e, no pós-operatório, os ratos do grupo quitosana foram tratados, diariamente, com 10 mg da quitosana pulverizada diretamente sobre cada lesão durante 21 dias e, posteriormente, os tecidos foram analisados histologicamente. Observou-se que no decorrer das semanas houve uma grande redução da largura das lesões em ambos os grupos, entretanto, ao final do experimento, essa redução foi significativamente superior no grupo que recebeu quitosana. Assim como neste estudo, onde no grupo tratado com quitosana observou-se redução da extensão da necrose no sétimo dia. Com isso, há a possibilidade de uma epitelização mais rápida da ferida.

Assim como Moura et al. (2014), não foi encontrado nenhum trabalho que tenha associado a LBI com o uso de quitosana, dificultando a comparação dos resultados encontrados. No presente trabalho a associação das duas técnicas não promoveu uma melhora estatística significativa no processo de reparo inflamatório inicial.

5 CONCLUSÃO

A utilização da biomembrana de quitosana junto com a LBI não acelerou o processo de reparo inflamatório inicial.

A LBI reduziu o infiltrado inflamatório bem como a extensão da necrose, favorecendo a cicatrização da ferida.

A quitosana estimulou a neoangiogênese e reduziu a extensão da necrose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. Rev Col Bras Cir. 2014;41(2):129-33.

Andrade PVC, Fukushima H, Abreu IE, Ambrósio LMBA, Rodrigues MF, De Carvalho VF, Holzhausen M. Laser de baixa potência na Periodontia: uma revisão do estado atual do conhecimento. Braz J Periodontol 2014;24(4):41-9.

Antunes JS, Karvat J, Aragão FA, Bertolin GRFB. Laser de baixa potência, no espectro de luz vermelha, em lesão nervosa periférica. Fisioter Pesqui 2015;5(1):43-8.

Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. Lasers Med Sci 2012;27(1):237-49.

Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, M. V. Lia Fook MVL, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. REMAP 2007;2(3):27-34.

Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuko S, Morimoto M, Saimoto H, Minami S, Okamoto Y. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials J Funct Biomater 2015;6:104-42.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Braz J Pharm Sci 2005;41(1):27-51.

Barros FC, Antunes SA, Figueiredo CMS, Fischer RG. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. R Ci Med Biol 2008;7(1):85-9.

Boras VV, Juras DV, Rogulj AA, Pandurić DG, Verzak Ž, Brailo V. Applications of Low Level Laser Therapy. J Oral Maxillofac Surg 2013:327-39.

Brito MKM, Schellini SA, Padovani CR, Pellizzon CH, Trindade-Neto CG. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. An Bras Dermatol. 2009;84(1):35-40.

Burkatovskaya M, Castano AP, Demidova-Rice TN, Tegos GP, Hamblin MR. Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice. Wound Repair Regen 2008;16(3):425–31.

Calisto FCFS, Calisto SLS, Souza AP, França CM, Ferreira APL, Moreira MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. Acta Cir Bras 2015;30(3):204-8.

Campana Filho SP, De Britto D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, et al. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. Quim Nova 2007;3(30):644-50.

Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007;20:51-8.

Cavalcanti TM, Almeida-Barros RQ, Catão MHCV, Feitosa APA, Lins RDAU. Knowledge of the physical properties and interaction of laser with biological tissue in dentistry. *An Bras Dermatol* 2011;86(5):955-60.

Da Silva TS, Mendes F, Alves AMP, Alves EPB, Bertolini GRF. Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência. *R Bras Bioci* 2010;8(3):264-7.

De Loura Santana C, de Fátima Teixeira Silva D, Deana AM, Prates RA, Souza AP, Gomes MT. Tissue Responses to Postoperative Laser Therapy in Diabetic Rats Submitted to Excisional Wounds. *PLoS ONE* 2015;10(4):1-13.

De Souza MV, Da Silva MO. Laserterapia em afecções locomotoras: Revisão sistemática de estudos experimentais. *Rev Bras Med Esporte* 2016;22(1):76-82.

Dias KB, da Silva DP, Ferreira LA, Fidelis RR, Costa JL, da Silva ALL, et al. Quitina e quitosana: características, utilizações e perspectivas atuais de produção. *J Biotec Biodivers* 2013;4(3):184-91.

Dragland IS, Rukke HV, Stenhagen ISR, Lönn-Stensrud J, Kopperud HM. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Low Viscosity Chitosan against *Staphylococcus epidermidis*. 2016 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9159761>.

Freitas RPA, Barcelos APM, Nóbrega BM, Macedo AB, Oliveira AR, Ramos AMO, et al. Low-level laser therapy and micro current in burn wound healing in rats. Associated or isolated therapy? *Fisioter Pesq* 2013;20(1):24-30.

Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão de literatura. Rev Col Bras Cir 2010;37(4):295-302.

Kale TP, Singh AK, Kotrashetti SM, Kapoor A. Effectiveness of Hemcon Dental Dressing versus Conventional Method of Haemostasis in 40 Patients on Oral Antiplatelet Drugs. SQU Medical Journal 2012;3(12):33-5

Kumar KRA, Kumar J, Sarvagna J, Gadde P, Chikkaboriah S. Hemostasis and post-operative care of oral surgical wounds by Hemcon Dental Dressing in patients on oral anticoagulant therapy: a split mouth randomized controlled clinical trial. J Clin Diagn Res 2016;10(9):37-40.

Kyzas GZ, Bikiaris DN. Recent modifications of chitosan for adsorption applications: a critical and systematic review. Mar Drugs 2015;13(1):312-37.

Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. A efetividade do laser de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. Fisioter Pesq 2012;19(3):290-6.

Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Grancille-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. Rev Bras Dermatol 2010;85(6):849-55.

Mandebaum SH, Santis EP, Sant'Ana MH. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares Parte I. An bras Dermatol 2003;78(4):393-10.

Martins SS, Torres OJM, Dos Santos OJ, Limeira Junior FAL, Sauaia Filho N, Melo SPC, Santos RHP, Silva VB. Analysis of the healing process of the wounds occurring in rats using lasertherapy in association with hydrocolloid. *Acta Cir Bras* 2015;30(10):68.

Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol* 2009;84(3):257-62.

Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. *Acta Biomater* 2013(9):7093-14.

Moura RO, Nunes LCC, Carvalho MEIM, Miranda BR. feitos da luz emitida por diodos (LED) e dos compostos de quitosana na cicatrização de feridas: Revisão Sistemática. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2014;35(4):513-8.

Neves LS, Silva CMS, Henriques JFC, Caçado RH, Henriques RP, Janson G. A utilização do laser em Ortodontia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2005;10(5):149-56.

Novaes RDN, Gonçalves RVM, Cupertino MC, Araujo BM, Rezende RM, Santos EC et al. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. *Int J Exp Path* 2014;95:138-46.

Núñez SC, França CM, Silva DFT, Nogueira GEC, Prates RA, Ribeiro MS. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers Med Sci* 2013;28(2):633-41.

Paula S. Comparação do laser e do led no processo de cicatrização em feridas cutâneas: uma revisão. *Ciência&Saúde* 2016;9(1):55-61.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. *Quim Nova* 2015;38(7):957-71.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):307-13.

Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: Biometrical and histological study in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87 (2007) 145–53.

Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol* 2006;81(2):150-6.

Ruh AC, Fernandes S, Artoni FR, Favero GM. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. *Publ UEPG Ci Biol Saúde* 2013;19(1):11-9.

Silva EM, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanini AF. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *RSBO* 2007;4(2):29-35.

Silva HSRC, dos Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim Nova* 2006;29(4):776-85.

Sinhoreti MA, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2013;67(3):178-86.

Spin-Neto R, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio Júnior E. Biomateriais a base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Rev Odontol UNESP* 2008; 37(2):155-161.

Tavaria FK, Costa EM, Pina-Vaz I, Carvalho MF, Pintado MM. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Rev Bras Eng Biom* 2013;29(1):110-20.

Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina, Ribeirão Preto* 2008;41(3):259-64.

Vidal-Ramos LA, Brito MM, Queiroz WWMQ, Santos DS, Dias CAGM, De Oliveira JCS, Pin AS, Baraúna KMP. A eficácia do laser de baixa potência na cicatrização de úlcera de decúbito em paciente diabético: Estudo de Caso. *Biota Amazonia* 2014;4(2):74-9.

ANEXO



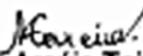
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da reparação inflamatória inicial, com uso biomembrana de quitosana e laser de baixa intensidade, em calvária de ratos", registrada com o nº 746/2016, sob a responsabilidade de José Peixoto Ferrão Júnior - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, em reunião de 21/03/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/03/2015 a 10/12/2016
Espécie/Linhagem/Raça	Rattus norvegicus / Wistar
Nº de animais	39
Peso/Idade	250g/10 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 22 de março de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186