

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

VINÍCIUS SALIM SILVEIRA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO EM ENXERTOS DE DERME  
ACELULAR, ESTIMULADO POR LASER NÃO ABLATIVO**

PORTO ALEGRE  
2012

**VINÍCIUS SALIM SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO EM ENXERTOS DE DERME  
ACELULAR, ESTIMULADO POR LASER NÃO ABLATIVO**

Linha de pesquisa: Biocompatibilidade de materiais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (projeto de pesquisa avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – registro CEUA 11/00241).

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Gerhardt de Oliveira

Porto Alegre/RS  
2012

S587a Silveira, Vinicius Salim

**Avaliação histológica do reparo em enxertos de derme  
acelular, estimulado por laser não ablativo / Vinicius Salim  
Silveira. – Porto Alegre, 2012.**

**97 f.: gráf. il. tab.**

Dissertação (Mestrado) – PUCRS, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gerhardt de Oliveira.

1. Odontologia. 2. Cirurgia Bucomaxilofacial. 3. Laser -  
Terapia. 4. Ratos – Experiência. I. Silveira, Vinicius Salim. II.  
Oliveira, Marília Gerhardt de. III. Título.

**CDD 617.52**

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza, CRB 10/1441

Dedico esta dissertação, do fundo do meu coração

ao meu pai, Mário,

à minha mãe, Eunice,

ao meu irmão, Bernardo e,

especialmente, à minha noiva, Gabriela.

Todo o apoio que sempre precisei encontrei em vocês.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Professora Doutora Marília Gerhardt de Oliveira, pela excelente orientação que se estende desde o curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial que cursei sob sua orientação. Pela grande amizade que construímos e pelo exemplo de profissional que é. Muito obrigado!

Ao Professor Doutor João Batista Burzlaff, por ter sido um amigo incondicional desde os tempos de graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul além de excelente cirurgião bucomaxilofacial, exercendo nossa profissão com maestria incomparável o que, certamente, influenciou na minha escolha em seguir esses passos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Livia Prates Soares Zerbinatti, pelo auxílio de fundamental importância para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Adriana Etges, por ser essa pessoa prestativa, solícita, acessível e muito dedicada que é. Muito obrigado.

Ao Professor Doutor João Feliz Duarte de Moraes pelo grande apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Ao técnico Arno Kieling Steiger, do Instituto IDEIA da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Profissional competéssimo e sempre disponível.

Aos grandes amigos e colegas de Especialização Rodrigo Alberto Cenci, Leonardo Tonietto e Patricia Fregapani Worm. Certamente três grandes influências na minha caminhada na cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial.

A todos os professores do Curso de Mestrado em CTBMF da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelos preciosos ensinamentos recebidos durante o curso.

À colega, aluna de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Caroline Giongo, pessoa muito querida e prestativa.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu Diretor, Professor Marcos Tulio Mazzini Carvalho. Com grande estima, por ser uma casa que me acolheu muito bem e muito contribuiu para minha formação.

À Capes por ter financiado o Curso, o que viabilizou a conclusão do mesmo.

“...se hoje fosse o último dia da minha vida,  
queria fazer o que vou fazer hoje?  
E se a resposta fosse (NÃO) muitos dias seguidos,  
Sabia que precisava mudar algo...”  
Steve Jobs

## RESUMO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a integração do enxerto de derme acelular Alloderm® (LifeCell Corp., The Woodlands, TX) em sítios de implantação e comparar tal integração entre grupos que receberam incidência de laser não ablativo e grupos que não receberam essa incidência, por meio de análise da quantidade de fibroblastos no interior do enxerto e de avaliação do processo cicatricial e da reposta inflamatória do organismo em torno do mesmo. Foram inseridos no tecido subcutâneo da região calvaria de 32 ratos (*Rattus Norvegicus*, Wistar) fragmentos padrões de 5mm<sup>2</sup> de Alloderm®. Aplicou-se laserterapia de 4J/cm<sup>2</sup> por sessão iniciando imediatamente após a intervenção cirúrgica e fazendo mais três incidências com intervalos de 48 horas. As mortes dos animais ocorreram no primeiro, terceiro, sétimo e décimo quarto dias de pós operatório e as peças foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.). Na análise das lâminas foi observada, presença significativamente maior de edema no grupo controle, em todos os períodos de observação, em comparação ao grupo irradiado com laser. Observou-se também ausência de infiltrado inflamatório neutrofítico no grupo irradiado com laser em todos os períodos estudados, estando o mesmo infiltrado presente significativamente no grupo controle em três dos quatro períodos estudados. Observou-se infiltrado linfocítico desde o primeiro período de verificação no grupo irradiado, sendo que no grupo controle este tipo de infiltrado começou a ser observado no segundo período de observação. Além disso, observou-se ainda, uma vascularização bem mais intensa no grupo controle quando comparado ao irradiado. Não se verificou diferença significativa entre os grupos na quantidade de fibroblastos no interior do enxerto. Os resultados encontrados sugerem que a terapia adicional com laser não ablativo é efetiva no processo cicatricial e na integração do enxerto de derme acelular.

<sup>1</sup>**Descritores:** Terapia a Laser; Enxertos; Cicatrização; Ratos

---

<sup>1</sup> DECs: Terapia Laser; Enxertos; Cicatrização; Ratos



## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the integration of an acellular dermal matrix graft (AlloDerm<sup>®</sup>; LifeCell Corp., The Woodlands, TX) at the implantation site and to compare integration rates between groups receiving and not receiving nonablative laser treatment by the quantification of fibroblasts within the graft and assessment of the healing process and inflammatory response around the graft. Standard 5-mm<sup>2</sup> AlloDerm<sup>®</sup> sheets were implanted into the subcutaneous tissue in the calvaria of 32 Wistar rats (*Rattus Norvegicus*). Laser therapy was given at a dose of 4 J/cm<sup>2</sup> per session immediately after surgical intervention, followed by 3 additional applications at 48-h intervals. The animals were killed 1, 3, 7, and 14 days after surgery. The specimens were stained with hematoxylin-eosin (HE). Analysis of the slides showed a significantly higher amount of edema in the control group at all observation time points, compared to the laser-irradiated group. Absence of neutrophilic inflammatory infiltrate was observed in the laser-irradiated group at all time points, but a significant amount of this infiltrate was found in the control group at 3 of the 4 observation time points. Lymphocytic infiltration was evident as early as the first observation time point in laser-irradiated animals, whereas in controls this type of infiltration was observed only after the second time point. In addition, the control group showed significantly greater revascularization than the laser-irradiated group. There was no significant difference between groups in the quantity of fibroblasts within the graft. These findings suggest that additional nonablative laser therapy is effective in the healing and integration of acellular dermal grafts.

<sup>1</sup>**Keywords:** Laser therapy; Grafts; Wound healing; Rats

---

<sup>1</sup> DECs: Laser Therapy; Grafts; Wound healing; Rats

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tricotomia da região calvária, assepsia, isolamento do campo operatório e incisão com 1 cm de comprimento.....	43
Figura 2: Inserção do material de forma linear no envelope intradérmico.....	44
Figura 3: Fotomicrografia do Grupo 1A. Leve presença de fibroblastos.....	52
Figura 4: Fotomicrografia do Grupo 1A. Presença de moderado infiltrado inflamatório neutrofílico, intenso edema e moderada presença de células endoteliais intensa vascularização.....	53
Figura 5: Fotomicrografia do Grupo 1B. Infiltrado neutrofílico intenso, infiltrado linfocítico moderado, células endoteliais e edema moderados e presença de fibroblastos.....	54
Figura 6: Fotomicrografia do Grupo 1C. Vascularização e infiltrado linfocítico moderados, edema, células endoteliais e infiltrado neutrofílico leve e presença leve de fibroblastos.....	55
Figura 7: Fotomicrografia do Grupo 1D. Presença leve de células endoteliais, fibroblastos e vascularização, moderado infiltrado linfocítico.....	56
Figura 8: Fotomicrografia do Grupo 2A. Vascularização moderada, presença leve de células endoteliais, infiltrado linfocítico e fibroblastos.....	57
Figura 9: Fotomicrografia do Grupo 2B. Vascularização moderada e presença leve de infiltrado linfocítico, células endoteliais e fibroblastos.....	58
Figura 10: Fotomicrografia do Grupo 2C. Presença de moderada a intensa de	

fibroblastos e moderada de infiltrado linfocítico. Presença leve de vascularização e células endoteliais.....59

Figura 11: Fotomicrografia do Grupo 2D. Presença moderada de infiltrado linfocítico e fibroblastos e presença leve de vascularização e células endoteliais.....60

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Organização dos grupos e dos subgrupos de acordo com os períodos de estudo.....	40
Quadro 2 - Protocolo de radiação com <i>laser</i> InGaAIP (doses totais por subgrupo).....	46
Quadro 3 – Graduação da intensidade das alterações histopatológicas observadas.....	48
Quadro 4 – Resumo dos resultados obtidos na análise descritiva dos grupos.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 1.....	61
Tabela 2 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 3.....	62
Tabela 3 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 7.....	63
Tabela 4 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 14.....	64

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente ao edema do grupo controle para a variável tempo.....65
- Gráfico 2 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente à vascularização do grupo controle para a variável tempo.....66
- Gráfico 3 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente às células endoteliais do grupo controle para a variável tempo.....66
- Gráfico 4 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente às células endoteliais do grupo controle para a variável tempo.....67
- Gráfico 5 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos linfócitos do grupo controle para a variável tempo.....68
- Gráfico 6 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente à vascularização do grupo laser para a variável tempo.....69
- Gráfico 7 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos linfócitos do grupo laser para a variável tempo.....70
- Gráfico 8 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos fibroblastos do grupo laser para a variável tempo.....71

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
REVISTA DE LITERATURA.....	21
METODOLOGIA.....	38
1. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	39
2. PREPARO DO BIOMATERIAL IMPLANTÁVEL.....	41
3. TÉCNICA CIRÚRGICA .....	41
4. RADIAÇÃO COM LASER NÃO ABLATIVO .....	44
5. PREPARO DAS AMOSTRAS .....	46
6. ANÁLISE MICROSCÓPICA .....	47
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
RESULTADOS .....	49
1. RESULTADOS DO EXAME MACROSCÓPICO .....	50
2. RESULTADOS DO EXAME MICROSCÓPICO .....	50
2.1. ANÁLISE DESCRITIVA .....	50
2.1.1. Grupo 1 (controle).....	51
2.1.1.1. Grupo 1A (controle 1 dia).....	51
2.1.1.2. Grupo 1B (controle três dias) .....	53
2.1.1.3. Grupo1C (controle sete dias) .....	54
2.1.1.4. Grupo 1D (controle 14 dias).....	55
2.1.2 Grupo 2 (laser).....	56
2.1.2.1. Grupo 2A (laser um dia) .....	56
2.1.2.2. Grupo 2B (laser três dias) .....	57
2.1.2.3. Grupo 2C (laser sete dias) .....	58
2.1.2.4. Grupo 2D (laser 14 dias).....	59
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
2.2.1 Variável Laser .....	60
2.2.1.1 Dia 1 .....	61
2.2.1.2 Dia 3 .....	62
2.2.1.3 Dia 7 .....	62
2.2.1.4 Dia 14.....	63
2.2.2 Variável Tempo .....	64
2.2.2.1 Grupo Controle.....	64
2.2.2.1.1 Edema .....	64
2.2.2.1.2 Vascularização.....	65
2.2.2.1.3 Células Endoteliais .....	66
2.2.2.1.4 Neutrófilos .....	67
2.2.2.1.5 Linfócitos .....	67
2.2.2.1.6 Fibroblastos.....	68
2.2.2.2 Grupo Laser .....	68
2.2.2.2.1 Edema .....	68
2.2.2.2.2 Vascularização.....	69
2.2.2.2.3 Células Endoteliais .....	69
2.2.2.2.4 Neutrófilos .....	69
2.2.2.2.5 Linfócitos .....	70
2.2.2.2.6 Fibroblastos.....	70
DISCUSSÃO .....	72
CONCLUSÕES.....	78
BIBLIOGRAFIA.....	81

<b>ANEXO A</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO C</b> .....	<b>95</b>



# **INTRODUÇÃO**

Em defeitos de tecidos moles, o uso de retalho local ou retalho livre pode ser recomendado. Mas, quando a clínica geral do paciente requerer cuidados médicos ou se estiver presente uma vascularização insuficiente na área, o uso de retalhos fica dificultado (1).

Os avanços no processamento de técnicas e na recuperação de tecidos para transplantes resultaram no desenvolvimento de matrizes dérmicas acelulares de origens humana e animal (2).

A Alloderm<sup>®</sup> é uma matriz de derme acelular proveniente de pele humana de cadáver. Essas peças são preparadas com tratamento enzimático da pele, a camada epidérmica é removida e as células são retiradas da camada basal remanescente, assim como da derme, e subsequentemente são liofilizadas (1).

A Alloderm<sup>®</sup> vem sendo utilizada clinicamente, desde 1992, como enxerto para reposição de derme em pacientes com queimaduras agudas, provendo tecido suficiente para reduzir a formação de cicatrizes e a contração da ferida (3).

Existem inúmeros estudos na literatura relatando a utilização do Alloderm<sup>®</sup> nos mais diversos sítios, desde cirurgias periodontais até cirurgias de reparo tecidual sobre região calvária exposta (1;4). Porém não se encontram na literatura estudos relacionando o uso de Alloderm<sup>®</sup> com a aplicação do LLLT.

O laser de baixa potência tem sido reconhecido por seu potencial biomodulatório, antiinflamatório e analgésico e por sua ação bioestimulatória nos

tecidos. A bioestimulação ocorre pelo aumento ao ATP mitocondrial, que, por sua vez, aumenta o metabolismo celular, a proliferação de fibroblastos, a produção de fibronectina (proteína adesiva envolvida no processo de crescimento e diferenciação celular) e a expressão de fibras colagênicas e elásticas antes e durante o processo de cicatrização (5).

O laser é uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta, de acordo com o tipo empregado, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares, sendo uma forma de energia não ionizante. Ao contrário de outras formas de radiação usadas com fins terapêuticos, como, por exemplo, os raios X, raios gama e de nêutrons, a radiação laser não é invasiva, mostrando-se muito bem tolerada pelos tecidos (6).

Na Odontologia, o laser tem sido utilizado cada vez mais em cirurgias, tratamento de hipersensibilidade dentinária, casos de pericoronarite, aftas e herpes simples; é empregado também em anestésias e na aceleração do processo de cicatrização cirúrgica (7).

A biomodulação é uma das áreas de maior controvérsia no uso de lasers em Odontologia. Enquanto diversos autores consideram-no eficaz na analgesia e estimulação da cicatrização pós-operatória (6;8), outros pesquisadores não encontraram efeito algum com o uso do laser não ablativo (9; 10; 11).

Apesar de algumas opiniões contrárias, o laser continua a ser estudado com base nas pesquisas de Endre Mester (12; 13). Os autores indicam o laser como a

mais significativa descoberta no campo das ciências médicas no século XX, envolvendo inúmeras perspectivas em pesquisas biológicas e na prática da Medicina e da Odontologia.

Esta pesquisa teve como objetivo investigar, por meio de análise histológica, a influência do laser não ablativo de Fosfeto de Índio Gálio Alumínio (InGaAlP) com  $\lambda=685\text{nm}$  (vermelho) no processo de reparo de enxertos dérmicos acelulares (Alloderm<sup>®</sup>), inseridos na derme de ratos *Wistar*.

**REVISTA DE LITERATURA**

O enxerto autógeno de pele e mucosa é a forma mais comum de tratamento, porém existem atualmente inúmeros materiais disponíveis comercialmente que podem ser utilizados como repositórios de tecidos moles temporária ou permanentemente (14; 15).

Verifica-se grande interesse no desenvolvimento de tecidos orgânicos, como a derme e a epiderme a partir de matrizes biológicas ou sintéticas (16; 17). A Engenharia de Tecidos ou Bioengenharia constitui um grande avanço na área de reparo tecidual, sendo seu aparecimento decorrente das limitações associadas ao uso de enxertos autógenos (15).

Durante os últimos 25 anos, a Engenharia de Tecidos desenvolveu-se e progrediu rapidamente, em especial na área da regeneração da pele. Hoje, uma infinidade de enxertos alógenos está disponível e aprovada pelo FDA para livre comércio, além de muitos outros que se encontram em fase de pesquisa e aprovação (18).

A procura por um biomaterial seguro e de fácil acesso para extensa aplicação em diversos procedimentos reconstrutivos de tecido mole continua sendo um dos mais importantes objetivos cirúrgicos. Diversos materiais sintéticos, como silicone e polietileno, assim como tecidos autógenos, como gordura, derme e fascia muscular, são utilizados como enxertos dérmicos ou cutâneos. O índice de sucesso clínico obtido com a utilização destes materiais é relativamente satisfatório, quando aplicados após um diagnóstico apurado e uma técnica cirúrgica impecável. No entanto, apesar das suas diferentes vantagens, todos estes biomateriais apresentam

desvantagens intrínsecas, incluindo a formação de cicatrizes no sítio doador, reabsorção com perda de volume do enxerto autógeno e baixa vida útil dos sintéticos (19).

Os enxertos dérmicos são incorporados ao tecido do hospedeiro por um mecanismo biológico de absorção enzimática, neovascularização, além de infiltração celular com nova remodelação tecidual. A remodelação requer a incorporação e proliferação de células fibroblásticas no tecido implantado (20).

A procura contínua de um material seguro para a substituição dérmica pela Bioengenharia é justificada e baseia-se na conjunção das melhores características dos materiais sintéticos e autógenos. Ou seja, um material que seja largamente disponível, integre-se biologicamente e seja substituído gradativamente pelo tecido normal (19).

Reações de corpo estranho e potencial para agir como um sítio para infecção e processo inflamatório, especialmente em sítios contaminados, constitui risco que tem sido encontrado em alguns materiais sintéticos (21).

É amplamente aceito que a derme é relativamente inerte sob o ponto de vista imunológico. Porém, em contraste à natureza pouco imunogênica dos fibroblastos, os queratinócitos são altamente imunogênicos. A existência de elementos foliculares epiteliais pode desencadear processos inflamatórios crônicos, levando ao aumento da contração do enxerto e à formação de cicatrizes (22).

Os enxertos alógenos de pele, rotineiramente utilizados na reabilitação de pacientes queimados após a excisão primária dos tecidos inviáveis, tendem a ser rejeitados em decorrência da reação de corpo estranho, desencadeada por antígenos presentes nas células da epiderme e da derme. Este é um fenômeno limitante, pois a matriz de colágeno do enxerto alógeno seria uma excelente base para o crescimento fibrovascular e para a remodelação com colágeno autógeno. A remoção da camada externa do epitélio e das células remanescentes da derme é uma abordagem em potencial para a criação de um enxerto colagenoso compacto que possa ser implantado sem o risco de reação de corpo estranho (23).

Alloderm<sup>® 1</sup> é um enxerto de derme desenvolvido a partir de pele humana cadavérica e processada por meio da remoção da epiderme, da remoção das células da camada basal remanescente, assim como da derme, passando por posterior processo de liofilização (1). O resultado deste processo é uma matriz dérmica intacta composta por colágeno dos tipos IV e VII, elastina e laminina (23). A matriz dérmica acelular permanece estruturalmente intacta, tanto em relação à membrana basal quanto à sua trama de colágeno (24).

A aplicação de uma derme acelular, para reposição permanente de tecido perdido, baseia-se na teoria de que a matriz acelular serviria como um arcabouço para a formação de uma arquitetura tecidual normal (25). A evidência clínica da importância da integridade da matriz na cicatrização normal da pele foi demonstrada por estudos com crioterapia. Uma vez que as queimaduras causadas pelo frio resultam na destruição das células, mas não da matriz extracelular. Tais lesões

---

<sup>1</sup> LifeCell Corporation, Woodlands, TX.(EUA)



cicatrizam mais rapidamente que as queimaduras por calor. Histologicamente observa-se nas queimaduras por frio a manutenção do arcabouço da matriz tecidual, não ocorrendo posteriormente a formação de tecido de granulação nem cicatrizes (26).

Enquanto a fonte doadora é semelhante para todas as matrizes de derme acelular humanas, as diferenças de técnica de recuperação e processamento do material podem implicar diferentes resultados clínicos. O processamento do tecido pode ter profundo efeito sobre as propriedades do manuseio e do desempenho dos enxertos de matriz de derme acelular humana *in vivo*, observando-se atraso na infiltração celular resultante dos diferentes processos (27). LIVESEY et al., (24) elaboraram um processamento de pele, com detergentes e por meio do congelamento e de desidratação, que não danifica a membrana basal, podendo ser executado em curto período de tempo.

É realizada uma pesquisa da história do doador por meio de seus registros médicos. A partir daí a pele derivada de cadáveres é submetida a testes imunológicos para a detecção de possíveis patógenos no enxerto, tais como HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana- tipo I), HIV-2 (vírus da imunodeficiência humana- tipo II), HBV (vírus da hepatite B), HTLV-I (vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I) , HTLV-II (vírus linfotrópico de células T humanas do tipo II) e sífilis. Durante o processamento, o tecido passa por três etapas básicas. A primeira é a remoção da epiderme pela quebra das ligações com a derme. Depois são removidas as células da camada dérmica com detergentes de baixo peso molecular, sendo a matriz estabilizada através da inibição das metaloproteinases. Por último, o

enxerto é congelado e desidratado para conservar todas as estruturas e preservar a integridade do tecido, evitando-se, assim, uma possível rejeição (1; 28).

Segundo MIZUNO, TAKEDA e UCHINUMA (29), a derme acelularizada, ao ser transplantada, cria um espaço vazio que é ocupado por fibroblastos e outras células do hospedeiro. Os fibroblastos e os capilares invadem estes espaços através da interface leito receptor-enxerto e tendem a proliferar em direção à intimidade do tecido. Novas fibras colágenas são produzidas e substituem as fibras existentes no enxerto, que estão sendo reabsorvidas. Após quatro semanas de implantação da derme acelular, é visível a presença de novas fibras por toda a superfície e no interior do enxerto.

O processo que resulta da reconexão e revascularização do enxerto é chamado de integração, e a observação da proliferação fibrovascular dentro de um biomaterial implantado significa que o mesmo foi integrado ao tecido nativo (30). EPPLEY (23) demonstrou que Alloderm<sup>®</sup> é revascularizada ainda nos períodos iniciais de cicatrização, ao implantá-la na pele da orelha de coelhos. O experimento evidenciou a migração de células endoteliais a partir de todas as faces do enxerto e a formação de vasos no interior do enxerto subdérmico após 28 dias de implantação.

Autores relatam que a matriz dérmica acelular não induz reações inflamatórias específicas em resposta ao enxerto local (19; 20; 31; 32). A explicação para tal fenômeno é que a resposta imune, geralmente desencadeada em aloenxertos de pele, é direcionada aos componentes celulares presentes no tecido. A rejeição do enxerto é resultado de uma reação imune mediada por células. Isto

ocorre devido à presença dos antígenos de classe II (MHC) nas células do enxerto. As células epidérmicas potencialmente imunogênicas são os queratinócitos hiperproliferativos e as células de Langerhans (33). Na derme, os fibroblastos e as células endoteliais podem expressar antígenos MHC-II na presença de IFN- $\gamma$  (interferon-gama), que é um dos mediadores da degradação da matriz extracelular e pode ser expresso durante a fase de cicatrização do enxerto (34). Apesar da imunogenicidade da derme ainda ser um assunto controverso na literatura, estudos histológicos demonstraram que a resposta imunológica direcionada especificamente às células endoteliais resulta em oclusão vascular, isquemia e perda subsequente do enxerto (35). Portanto, a remoção completa das células do enxerto alógeno resulta em uma ausência de reações inflamatórias inconvenientes.

A Alloderm<sup>®</sup> tem sido utilizada em uma ampla gama de áreas, incluindo extensões de tecidos moles para fins cosméticos, enxertos de pele em pacientes com queimaduras, substituição da membrana timpânica, septo nasal e dura-máter e reconstrução da parede abdominal (1; 20; 36).

Na Odontologia, a Alloderm<sup>®</sup> tem demonstrado bons resultados e alto índice de sucesso terapêutico. Na Periodontia, a derme acelular vem sendo aplicada no recobrimento radicular em casos de recessões gengivais marginais, e nestes casos a vantagem mais óbvia é a possibilidade de tratar múltiplos sítios sem depender da quantidade de tecido doador disponível no paciente (37; 38; 39). Também é possível aumentar a espessura e a extensão de gengiva queratinizada com o enxerto de Alloderm<sup>®</sup> em regiões mais suscetíveis a recessões gengivais e doença periodontal (40; 41).

O enxerto de Alloderm<sup>®</sup> é utilizado, ainda, no recobrimento de implantes e enxertos ósseos, além de áreas estéticas, fechamento de comunicações bucossinusais e bucoantrais e em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (4; 42; 43; 44).

Os enxertos de derme acelular são incorporados ao tecido hospedeiro por um mecanismo biológico de absorção enzimática, neovascularização, infiltração celular e remodelação do novo tecido, o que requer a incorporação e a proliferação de fibroblastos no tecido enxertado, uma vez que o mesmo será reabsorvido (20). Em pacientes comprometidos como diabéticos descompensados e radioterapizados, é necessário que se acelere o processo de cicatrização desse local.

A palavra laser é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) (45). Apesar de não ter inventado o laser, Einstein<sup>1</sup> (8) estabeleceu, em 1917, os princípios da emissão estimulada de fótons que foi a base para o desenvolvimento da técnica. Einstein utilizou a teoria matemática do fóton para examinar o caso de uma grande coleção de átomos carregados com energia em excesso e prontos para liberar fótons em direções e em tempos aleatórios. Se um fóton desgarrado passa por estes átomos, o estímulo da presença do fóton estimula a emissão precoce da energia acumulada em excesso. E, surpreendentemente, os fótons liberados seguirão a mesma direção e terão a mesma frequência que o fóton desgarrado (6).

---

<sup>1</sup> EINSTEIN, A. Zur quantentheorie der strahlung. **Physiol. Z.**, n. 18, p. 121-128, 1917.

O que faz o laser ser diferente da luz comum são suas características peculiares e importantes, tais como: constituir-se em uma fonte monocromática que pode atingir alta intensidade, ser coerente e altamente concentrada, assim como ser unidirecional (8).

Os lasers têm sido classificados de acordo com inúmeros critérios. A mais ampla classificação refere-se à sua ação terapêutica, que os separa em lasers ablativos, cirúrgicos ou de alta potência e em não-ablativos, clínicos, não cirúrgicos ou terapêuticos. Os aparelhos podem também ser classificados, de acordo com o seu funcionamento, em contínuos, pulsados e desencadeados, bem como, de acordo com a natureza de seu meio ativo, em sólidos, líquidos, gasosos e mistos (6).

O laser diodo é um *chip* semicondutor que funciona como um diodo elétrico, com comprimento de onda variando entre 620 e 1500nm, nos espectros vermelho e infravermelho, determinados pelo tipo de material semicondutor utilizado. Na maioria dos semicondutores, a energia é liberada na forma de calor. Porém, em materiais como Gálio, Alumínio e Arsênio, a energia é liberada na forma de fótons (6). Os mais comuns são, geralmente, variações do Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAIs), que emitem um espectro na faixa do infravermelho ( $\lambda=700$  a 940nm), ou do Fosfeto de Índio Gálio Alumínio (InGaAlP), que emite espectro visível de luz vermelha ( $\lambda=600$  a 680nm), com potência tipicamente entre 10 e 50mW (46; 47).

O laser não ablativo ou terapêutico vem sendo utilizado como auxiliar no reparo tecidual, para aliviar a dor e controlar a inflamação e o edema pós-trauma

local. Atualmente, também vem sendo empregado para o diagnóstico precoce da cárie dentária (45).

O laser não ablativo tem sido reconhecido pelo seu potencial biomodulatório, anti-inflamatório e analgésico, além de sua ação bioestimulatória sobre os tecidos, o que ocorre como resultado do aumento do ATP mitocondrial, que, por sua vez, aumenta o metabolismo celular, a proliferação de fibroblastos, produção de fibronectina, assim como a expressão de fibras colagênicas e elásticas antes e durante o processo de cicatrização (48; 49).

A interação do laser com o tecido é determinada por alguns fatores como: composição de seu meio ativo, comprimento de onda, densidade de potência, quantidade de energia depositada no tecido, forma de emissão do laser (contínua, pulsada ou desencadeada), taxa e duração da pulsação, utilização ou não de fibras de contato e tipo de raio (focado ou desfocado) (6). Além disso, fatores concernentes aos tecidos, seus componentes citoplasmáticos celulares (70 a 85% de água, 10 a 20% de proteínas, 2% de lipídios, 1% de carboidratos e eletrólitos) irão determinar as propriedades ópticas específicas para cada tipo de tecido. Assim, haverá respostas teciduais distintas de acordo com os coeficientes de absorção e difusão em cada tecido (48).

O conceito de densidade de energia (DE) é definido como a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de radiação do raio de luz *laser*, podendo ser expresso em *joules* por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ). A fotoativação do laser não ablativo não ocorre somente na área de incidência do feixe

do raio, mas também em uma área igualmente distribuída ao seu redor, de forma tridimensional. Baseado nos princípios de difusão, transmissão e reflexão do feixe de laser que atinge o tecido, dependendo do comprimento de onda, a região de eficiência do laser estende-se por cerca de 1 cm de diâmetro, tendo como centro o ponto de incidência do feixe. Não se pode, porém, definir exatamente a profundidade alcançada, nem a dose que atinge alvos abaixo do ponto de incidência, o que dificulta o conhecimento da dosimetria exata (45; 48).

A fórmula que expressa o conceito de densidade de energia é:

$$DE = \frac{E}{S} = \frac{P(W) \times t(s)}{S(\text{cm}^2)} = \frac{\text{Watts} \times \text{segundos}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$$

Sendo que:

E = energia

S = área

P = potência

J = *joule*

t(s) = tempo, em segundos.

Para induzir um fator bioestimulador ótimo, a dose de radiação tem limites máximos e mínimos. Se a dose for muito baixa, ela pode induzir a um efeito tão pequeno que se torna não mensurável. Se for muito alta, pode levar a um efeito negativo no tecido (47).

MESTER et al, (12) observaram o efeito de baixas doses de laser na regeneração de feridas induzidas mecanicamente e em queimaduras. Os autores avaliaram o efeito do laser rubi com comprimento de onda de 6,943Å, densidade de energia variando de 0,5 a 10J/cm<sup>2</sup> e doses de 1,0, 4,0 e 5,0 J/cm<sup>2</sup> em queimaduras realizadas por eletrocoagulação. A cicatrização estimulada pela radiação laser

envolveu uma velocidade aumentada de crescimento epitelial. Os resultados mostraram que a radiação laser estimulou não somente a fagocitose, o crescimento de pêlos e o crescimento neoplásico, como também a cicatrização de feridas induzidas mecanicamente.

MESTER, MESTER e MESTER (13) em estudo retrospectivo revisaram o uso experimental e clínico de lasers por um período de 20 anos. Os autores avaliaram, inicialmente, os efeitos do laser rubi e, posteriormente, do HeNe e do gás argônio, em 15 sistemas biológicos. Em decorrência dos resultados positivos dos experimentos feitos, os autores começaram, em 1971, a utilizá-los no tratamento de feridas humanas e úlceras de difícil cicatrização ou não cicatrizadas completamente. Foram observados histologicamente os eventos relativos à inflamação, à proliferação e à reorganização tecidual que representam as fases da cicatrização. A experiência, que obteve sucesso em 875 casos clínicos, e os resultados dos experimentos realizados com o objetivo de elucidar o processo de biorregulação da cicatrização convenceram os autores a recomendar o uso do laser para estimular a cicatrização tecidual.

Algumas pesquisas relataram pouco ou nenhum efeito da laserterapia na cicatrização de feridas (50; 51; 52; 53). Certos estudos são bastante divergentes, inclusive em relação ao efeito sistêmico do laser, pois a maioria deles utiliza um único animal para o grupo experimental e controle não irradiado (9).

O mecanismo exato pelo qual cada aplicação de laser promove a cicatrização de lesões cutâneas ainda é desconhecido. É sugerido que o aumento na produção



de colágeno e/ou a diminuição da inibição do contato celular podem desempenhar algum papel na ação do *laser* (54).

A resposta inflamatória aguda, particularmente observada na fase inicial, é compatível com uma reação à agressão aos tecidos causada pelo procedimento cirúrgico. O infiltrado inflamatório agudo é demonstrado principalmente pela presença de neutrófilos e depósito de fibrina, tendo sido observadas nas amostras coletadas no dia 7 do grupo controle. No grupo com irradiação de luz de laser a reação inflamatória foi mais branda. Ao longo do tempo os exsudatos de inflamação aguda diminuíram devido à regeneração do tecido, que foi caracterizado pela neovascularização e pela proliferação fibroblástica (49).

BAPTISTA et al., (55) realizaram um estudo para avaliar a fotobiomodulação do laser no Colágeno tipo IV durante a remodelação do tecido muscular esquelético após feridas em ratos e seus resultados, vindo a sugerir que houve uma modulação no conteúdo de colágeno na regeneração da ferida no grupo irradiado.

A bioestimulação laser é um fenômeno fotobiológico. A magnitude do efeito da bioestimulação depende do estágio fisiológico da célula antes da radiação. Isto explica por que o efeito da bioestimulação nem sempre é possível. Os efeitos curativos da fototerapia em casos de tratamento sistêmico podem ser explicados pelo fato da luz de baixa potência (azul, vermelha) atuar nas células excitáveis para gerar um potencial de ação nas mesmas (56).

VAN BREUGEL e DOP BAR (57) estimaram os efeitos individuais da densidade de potência e do tempo de exposição do laser em fibroblastos humanos pelo estudo da sua proliferação e da produção de colágeno tipo I *in vitro*. O laser HeNe (632,8nm) foi utilizado com uma dose total de 6,8mW. Culturas de fibroblastos humanos foram submetidas ao HeNe com várias doses de energia, variando a densidade de potência e o tempo de exposição. Em três dias consecutivos, as células foram irradiadas por períodos entre 0,5 e 10 minutos. A potência do laser variou de 0,55 a 5,98mW. Tanto o número de células quanto a produção de colágeno do tipo I foram determinados para cada condição de radiação. Os resultados mostraram que o laser com potências abaixo de 2,91mW pode melhorar a proliferação celular, enquanto potências mais altas (5,98mW) não apresentaram nenhum efeito. Os efeitos de estimulação foram mais pronunciados com tempos de radiação entre 0,5 e 2 minutos. A produção de colágeno tipo I foi inversa à proliferação celular: quando a proliferação celular aumentou, a de colágeno do tipo I diminuiu. A partir deste experimento ficou claro que o tempo de exposição e a densidade de potência determinam o efeito da radiação laser. Assim, a estimulação e a inibição das propriedades celulares observadas podem ser obtidas com o mesmo laser nas mesmas células.

De acordo com PINHEIRO et al. (6), a luz visível de 632,8 nm e 670nm apresentam um efeito mais pronunciado em lesões superficiais, enquanto a luz de 830nm, nas lesões profundas.

Os parâmetros que determinam a natureza dos efeitos do laser, em qualquer situação, podem ser assim resumidos: (1) parâmetros fixos que não podem ser

modificados pelo operador, incluindo o comprimento de onda, os coeficientes de absorção e de reflexão do tecido irradiado; (2) fatores variáveis que podem ser modificados pelo operador no equipamento ou na interface tecidual, incluindo potência do laser, modo contínuo ou pulsado, densidade de energia, tempo de exposição e refrigeração externa (água ou ar) (46).

Diferentes comprimentos de onda parecem ser absorvidos por distintos receptores. A maioria dos autores concorda que a melhora na cicatrização das feridas é devida ao aumento na proliferação celular. As alterações fotoquímicas estimuladas pela ação da luz, tanto na membrana celular quanto no núcleo da célula, resultam em aumento da vasodilatação local, angiogênese, produção de fibroblastos, síntese de colágeno, produção de linfócitos T e B, liberação de endorfinas locais e alterações nas prostaglandinas locais (mudanças fisiológicas como resultado da luz laser nos tecidos moles) (58). Este tipo de terapia é usado na estimulação da cicatrização dos tecidos moles, como anti-inflamatório, no alívio da dor e para estimular o sistema imune a fim de atenuar os efeitos infecciosos (5).

As reações vasculares durante a laserterapia também são consideradas como um dos possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos clínicos da luz laser, pois a circulação sanguínea é um determinante essencial para a cicatrização de feridas e para o alívio da dor. A melhora da circulação, devido à radiação com o laser, pode ser considerada um dos possíveis mecanismos da eficácia clínica do laser de baixa potência no tratamento da dor ou para promover a cicatrização de feridas (59).

KREISLER et al. (60) analisaram os efeitos da radiação laser na taxa de proliferação de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. Um grupo de 110 culturas de fibroblastos foram irradiadas com um laser diodo (GaAlAs; 809nm; 10mW) com doses entre 1,96J/cm<sup>2</sup> e 7,84J/cm<sup>2</sup>. O tempo de exposição variou entre 75 e 300 segundos. Outras 110 culturas de fibroblastos serviram como controle e não receberam radiação. O tratamento com laser realizou-se alternadamente: uma, duas e três vezes, em um intervalo de 24 horas. A taxa de proliferação foi medida pela atividade de fluorescência com o uso de um indicador adicionado à cultura celular. A proliferação foi determinada 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Os resultados mostraram que as células irradiadas revelaram uma atividade proliferativa consideravelmente maior. As diferenças foram muito significativas 24 horas após a radiação, mas diminuíram de uma maneira energia-dependente 48 e 72 horas após a radiação. Os autores concluíram que o efeito da laserterapia nos fibroblastos ficou evidente. Sua duração, entretanto, parece ser limitada. Os pesquisadores ressaltaram que os resultados encontrados podem ser clinicamente relevantes, indicando que tratamentos repetitivos são necessários para alcançar um efeito curativo do laser nas aplicações clínicas.

O possível efeito biomodulatório do laser não ablativo na cicatrização de feridas em tecido mole é um aspecto importante no tratamento cirúrgico. Em âmbito microscópico, ocorrem eventos relacionados à inflamação, proliferação e à reorganização tecidual (5; 13; 55).

Não existem relatos na literatura da aplicação do laser não-ablativo sobre enxertos não celularizados de tecido mole. Porém, em virtude de seus efeitos

curativos sobre a cicatrização tecidual, torna-se essencial a realização de pesquisas que elucidem sua ação e interação com os biomateriais cirúrgicos atualmente utilizados na rotina terapêutica.

## **METODOLOGIA**

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o registro CEUA 11/00241 (ANEXO A).

Foram utilizados trinta e dois (32) ratos da raça *Wistar*, *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, machos, adultos, clinicamente sadios, estando de acordo com a Lei Arouca (ANEXO B). Os animais foram criados e mantidos em condições sanitárias de biotério convencional, no Vivário/Biotério da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), Bahia. Todos os animais foram criados e selecionados pelo método *Random-Bred*, em vista do grau de variância genética similar que é esperada em uma população humana (61). Depois de submetidos ao controle de ectoparasitas, estavam aptos a constituir a população desta pesquisa. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida<sup>1</sup>, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, assim como água *ad libidum*.

## 1. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em dois grupos distintos, com 16 animais em cada, mantidos em gaiolas plásticas individuais, com cobertura metálica e assoalho forrado por serragem de pinho.

Em ambos os grupos, os períodos de observação foram de um dia, três, sete e 14 dias. Assim, cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos (A, B, C e D), com cinco animais cada, de acordo com o período de observação (Quadro 1).

---

<sup>1</sup> Ração NUVILAB CR1®/ Nuvital Nutrientes LTDA.

GRUPO	PROCEDIMENTOS	SUBGRUPOS	PERÍODO DE ESTUDO
1	Grupo controle, sem radiação	1 - A	1 dia
		1 - B	3 dias
		1 - C	7 dias
		1 - D	14 dias
2	Radiação sobre a epiderme na área do enxerto intradérmico	2 - A	1 dia
		2 - B	3 dias
		2 - C	7 dias
		2 - D	14 dias

**Quadro 4 - Organização dos grupos e dos subgrupos de acordo com os períodos de estudo**

Todas as gaiolas foram devidamente etiquetadas, durante o período de estudo, conforme o grupo e o subgrupo a que pertenceram os animais. Para a identificação dos espécimes, foi utilizada marcação com caneta de tinta permanente, na cauda de cada animal; o número de marcas indicou o número do animal. Todos foram acomodados individualmente em suas gaiolas e mantidos em uma sala separada, sob condições adequadas de temperatura (25°C), umidade relativa e ventilação, com intervalos de 12 horas entre claridade e escuridão.

Os procedimentos de manipulação, alimentação e limpeza foram realizados por pessoal treinado em bioterismo. A limpeza das gaiolas foi realizada diariamente, com água corrente, sabão e desinfetantes, com a finalidade de diminuir os riscos de contaminação e infecções.



## 2. PREPARO DO BIOMATERIAL IMPLANTÁVEL

A Alloderm<sup>®</sup> (LifeCell Corporation) foi obtida pré-embalada, em estado desidratado, com tamanho de 1 x 2 cm e espessura próxima a 1,27 mm. Após aberta a embalagem, o material foi reidratado, por 10 minutos, em solução salina<sup>1</sup>, à temperatura ambiente, de acordo com as normas do fabricante. Quando o material estava na consistência ideal, foi modelado com tesouras estéreis, na configuração desejada para a implantação (5 x 5 mm).

## 3. TÉCNICA CIRÚRGICA

Todos os procedimentos foram executados no laboratório de Cirurgia Experimental no Vivário/Biotério da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME).

As cirurgias foram realizadas utilizando-se instrumental padronizado para os dois grupos, esterilizado em autoclave, com vapor sob pressão (132°C, 2 atm de pressão)<sup>2</sup>. Todos os indivíduos da equipe cirúrgica utilizaram os equipamentos de proteção individual preconizados pelo Ministério da Saúde.

Os animais foram submetidos a anestesia geral, com a aplicação de injeção intramuscular de cloridrato de di-hidro-tiazina (Rompun<sup>®</sup>)<sup>3</sup> e ketamina (Dopalen<sup>®</sup>)<sup>4</sup> diluídos em uma relação de 1:1 e dose de 0,1ml/100g de peso. A indução anestésica

---

<sup>1</sup> Soro fisiológico 0,9%/ Alfa Rio Química LTDA.

<sup>2</sup> Autoclave Automático Horizontal/ Ortossíntese Ind. E Com. LDTA.

<sup>3</sup> Bayer S.A.-Saúde Animal

<sup>4</sup> Agribands do Brasil LTDA.

ocorreu em aproximadamente 2 minutos e o período anestésico perdurou aproximadamente 30 minutos. A anestesia foi conferida e assistida por um médico veterinário que acompanhou o procedimento cirúrgico. Os animais devidamente anestesiados foram colocados, individualmente, em decúbito ventral, sobre uma mesa de trabalho de 30 x 30 cm.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região da calvária com o auxílio de uma lâmina de barbear montada<sup>1</sup>. A assepsia da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%. Uma vez isolado o campo operatório, foi realizada uma incisão linear na pele da região calvária, em sentido transversal, paralela e a 1 cm da linha bipupilar. A incisão foi de 1 cm de comprimento e executada com lâmina de número n.º 15<sup>2</sup>, montada em cabo de bisturi de n.º 3, tipo Bard-Parker. A hemostasia foi realizada por meio da compressão da região com gaze estéril (Figura 1).

Foi realizada dissecação do tecido dérmico em direção céfalo caudal, com o auxílio de uma tesoura romba, para formar um retalho do tipo envelope. O enxerto foi posicionado no leito cirúrgico, de forma linear, com a região correspondente à lâmina basal voltada para a epiderme e suturado na extremidade posterior do retalho, no tecido suprajacente, utilizando-se fio monofilamentar de náilon preto (6-0)<sup>3</sup>, estéril, de 45cm de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5cm de comprimento e seção triangular (Figura 2). Esta manobra foi instituída para estabilizar o enxerto no local (34). Para auxiliar a apreensão dos tecidos, foi utilizada um pinça tipo Adson. Realizou-se a síntese do retalho com fio monofilamentar de

---

<sup>1</sup> Lâmina Excel/ Gillette do Brasil LTDA.

<sup>2</sup> DURAEDGE® blades/ Crescent® Inc.

<sup>3</sup> Mononaylon®/ Ethicon Co.

náilon preto (5-0), também estéril. O procedimento, desde a anestesia até a síntese dos tecidos, foi realizado em um animal por vez e de forma igual em todos os exemplares de todos os grupos.



**Figura 1: Tricotomia da região calvária, assepsia, isolamento do campo operatório e incisão com 1 cm de comprimento.**

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acompanhados até a recuperação da anestesia, devolvidos às suas respectivas gaiolas, previamente identificadas e numeradas. Os espécimes em estudo foram mantidos em monitoramento diário durante todo o período de observação até a morte.



**Figura 2: Inserção do material de forma linear no envelope intradérmico.**

Foi administrado fármaco analgésico, Paracetamol 80mg/kg, por via intraperitoneal, para controle de dor, uma vez ao dia, por um período de três dias.

#### 4. RADIAÇÃO COM LASER NÃO ABLATIVO

O aparelho utilizado nesta pesquisa foi o laser de diodo vermelho (InGaAlP)<sup>1</sup>, com potência máxima de 35mW e comprimento de onda de 685nm, com área da secção transversal de 0,02827cm<sup>2</sup>, em emissão contínua e de forma pontual. Para este estudo, o aparelho foi devidamente calibrado pelo fabricante.

A dose de radiação, logo após o ato operatório, foi de 4J/cm<sup>2</sup>, potência de 35mW e tempo de 1 minuto e 4 segundos, aplicada por contato direto da ponteira sobre a pele, acima do enxerto subdérmico. O cálculo para aplicação da dose correta seguiu a fórmula indicada no manual do fabricante:

---

<sup>1</sup> Thera Lase/ DMC Equipamentos, São Paulo, Brasil.

$$DE = \frac{P \times t}{S} = \frac{0,035 \times 64}{0,0028} = 80 \text{ J/cm}^2$$

A dosimetria é a quantidade de energia em *joules* (J) aplicada sobre uma área expressa em centímetro quadrado. A luz laser não se espalha pelo tecido de forma linear, por tanto considerar 1cm<sup>2</sup> como área padrão não garante um protocolo estável. Na fórmula demonstrada, a área corresponde à secção transversal da ponteira, e, segundo o manual do aparelho, por isto se deve aplicar um fator de correção igual a 20 no cálculo da dosimetria. Então, ao dividir o resultado da fórmula por 20, a dose aplicada é 4J/cm<sup>2</sup>.

Os animais foram irradiados, a cada 48 horas, com uma dose de 4J/cm<sup>2</sup>, em um período de até sete dias (36). As doses foram aplicadas de forma pontual, sobre a epiderme na área que correspondeu ao enxerto intradérmico, com exceção do grupo controle, que foi submetido ao mesmo processo, porém, tendo sido simulada a aplicação do laser. As doses totais estão descritas no Quadro 2.

De acordo com a regulamentação brasileira, o laser foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacionais para área em uso ou presença de radiação, observando os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com luz laser.

<b>SUBGRUPOS</b>	<b>DOSE TOTAL</b>
1 – A	0J/cm <sup>2</sup>
1 – B	0J/cm <sup>2</sup>
1 – C	0J/cm <sup>2</sup>
1 – D	0J/cm <sup>2</sup>
2 – A	4J/cm <sup>2</sup>
2 – B	8J/cm <sup>2</sup>
2 – C	16J/cm <sup>2</sup>
2 – D	16J/cm <sup>2</sup>

**Quadro 5 - Protocolo de radiação com laser InGaAIP (doses totais por subgrupo).**

## 5. PREPARO DAS AMOSTRAS

Quando atingiram o dia planejado para cada grupo (e subgrupo), foi realizada a eutanásia dos animais com isoflurano, respeitando-se, dessa forma, o que preconiza a Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (ANEXO C).

Após a constatação da morte dos animais pelos sinais vitais, as peças cirúrgicas foram removidas, contendo as áreas previamente operadas e 5mm de tecido sadio como margem de segurança, com o auxílio de uma tesoura tipo Matzemaum. Os segmentos de pele, tecido subcutâneo e enxerto foram fixados em formalina tamponada a 10%; posteriormente, na área correspondente ao enxerto, as peças foram seccionadas ao meio transversalmente e incluídas na superfície de corte, de modo a visualizarem-se as estruturas, da superfície à profundidade.

As peças foram submetidas ao processamento histológico de rotina, incluídas em parafina e coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.).

As peças foram seccionadas com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e posicionadas em três lâminas de vidro, obtendo-se assim um corte histológico para cada lâmina, perfazendo um total de 120 secções. Os cortes foram corados pela H.E. Foi escolhida uma lâmina de cada espécime, sempre a mais representativa para o estudo histológico.

## 6. ANÁLISE MICROSCÓPICA

Procedeu-se à observação microscópica e à descrição dos cortes histológicos, por dois examinadores, utilizando-se um microscópio óptico Zeiss Axiolab<sup>1</sup>, com aumentos de 40X e 100X. As lâminas foram previamente identificadas com um código para garantir que, durante a leitura, o examinador desconheça a qual grupo pertencia cada secção observada.

Como critério de avaliação do edema e do infiltrado polimorfo e mononuclear, assim como a determinação dos diferentes níveis de síntese de colágeno ao longo do experimento, o sistema de cruzes foi utilizado, obedecendo à graduação descrita no Quadro 3.

---

<sup>1</sup> Carl Zeiss/ Germany.

1 (-)	AUSENTE
3 (+)	MODERADO
5 (++)	INTENSO

**Quadro 6 – Graduação da intensidade das alterações histopatológicas observadas.**

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A operacionalização das variáveis de interesse foi realizada por meio de dois avaliadores. Para a verificação da concordância intra e inter-avaliadores utilizou-se o teste Kappa.

Por meio da estatística descritiva foram apresentados a média e o desvio padrão. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal\_Wallis, seguido daquele de Student-Newman-Keuls para comparação dos diferentes períodos. Para análise estatística da variável laser foi utilizado o teste de Mann-Whitney, indicado na literatura para testes não paramétricos entre duas variáveis.



## **RESULTADOS**

## 1. RESULTADOS DO EXAME MACROSCÓPICO

As peças cirúrgicas foram removidas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico da região operada, após a constatação da morte dos animais, nos espécimes de ambos os grupos.

Verificou-se ausência de processo infeccioso em todas as peças analisadas. Em diversos animais foi possível a visualização do enxerto quando observado pelo lado dérmico, com exceção do grupo irradiado de 14 dias de observação.

## 2. RESULTADOS DO EXAME MICROSCÓPICO

### 2.1. ANÁLISE DESCRITIVA

Os cortes histológicos analisados são referentes ao primeiro, terceiro, sétimo e 14.º dias pós-operatórios. Observou-se, na derme das secções de pele coradas pela H.E., a presença de material amorfo, eosinofílico correspondente ao enxerto, cuja interface serviu de objeto deste estudo.

Os resultados obtidos nos grupos controle e irradiado são apresentados resumidamente no Quadro 4.

	Fibroblastos	Vascularização	Neutrófilos	Linfócitos	Edema	Células endoteliais
GRUPO 1	Maior presença de fibroblastos nos dias 7 e 14.	Abundante no dia 3 e moderada nos dias 1 e 7.	Moderada no dia 1, abundante no dia 3 e leve no dia 7	Moderada nos dias 3, 7 e 14	Abundante no dia 1, moderada no 3 e leve no 7	Moderada nos dias 1 e 3 e leve nos dias 7 e 14
GRUPO 2	Maior presença de fibroblastos nos dias 3, 7 e 14.	Moderada nos dias 1 e 3	Ausente em todos os dias	Leve nos dias 1 e 3 e moderada nos dias 7 e 14	Ausente em todos os dias	Leve todos os dias

**Quadro 4 – Resumo dos resultados obtidos na análise descritiva dos grupos.**

Todos os espécimes são representados por:

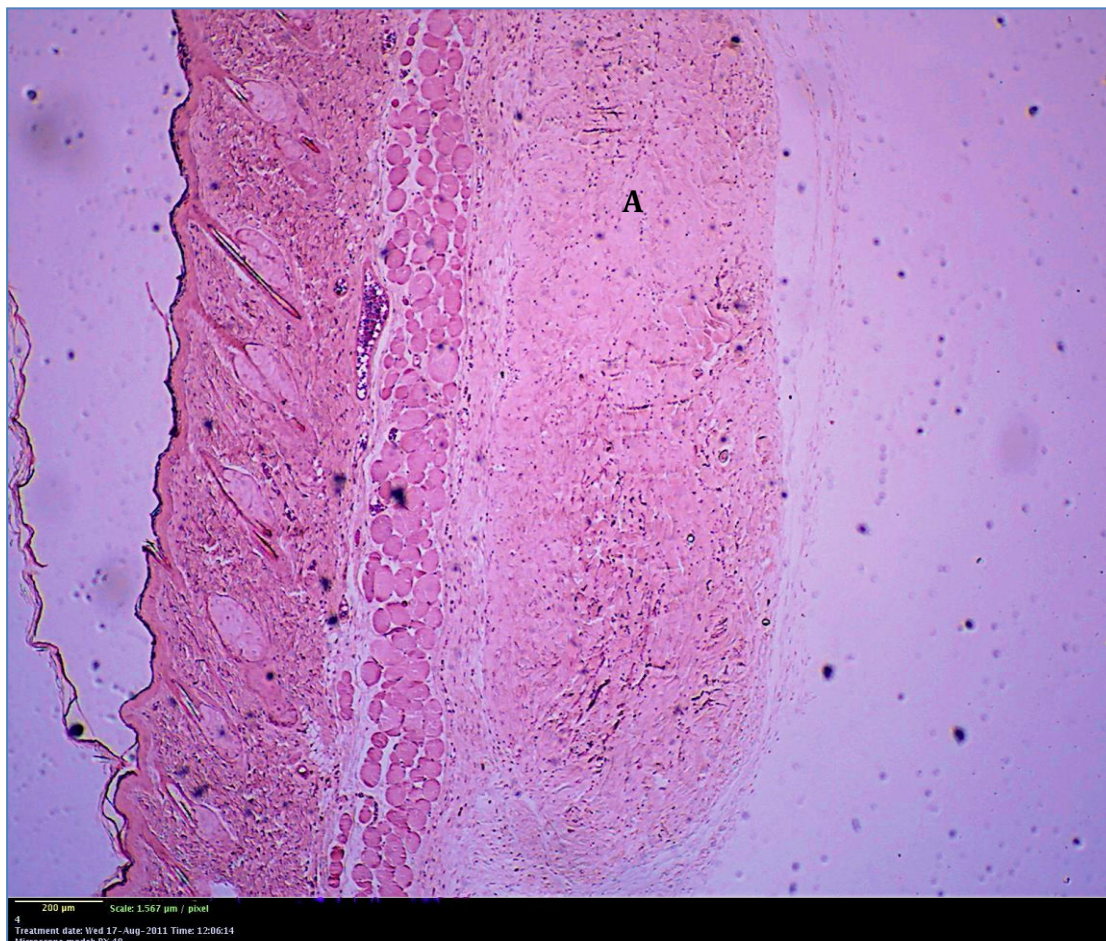
Cortes histológicos contendo fragmentos de epiderme composta por epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado. Na lâmina própria formada por tecido conjuntivo denso, observam-se fâmeras cutâneas. Na proximidade observam-se tecido adiposo e fibras musculares próprias da área. A partir daqui os cortes individualizam-se pela área em torno do enxerto.

#### 2.1.1. Grupo 1 (controle)

##### 2.1.1.1. Grupo 1A (controle 1 dia)

Após um dia de implantação no grupo controle, observou-se vascularização moderada, igualmente moderados infiltrado inflamatório neutrofílico e presença de

células endoteliais, além de intenso edema, assim como leve presença de fibroblastos e ausência de infiltrado linfocítico. (Figuras 3 e 4)



**Figura 3: Fotomicrografia do Grupo 1A. Leve presença de fibroblastos. Imagem observada em aumento de 4x. Alloderm® (A)**

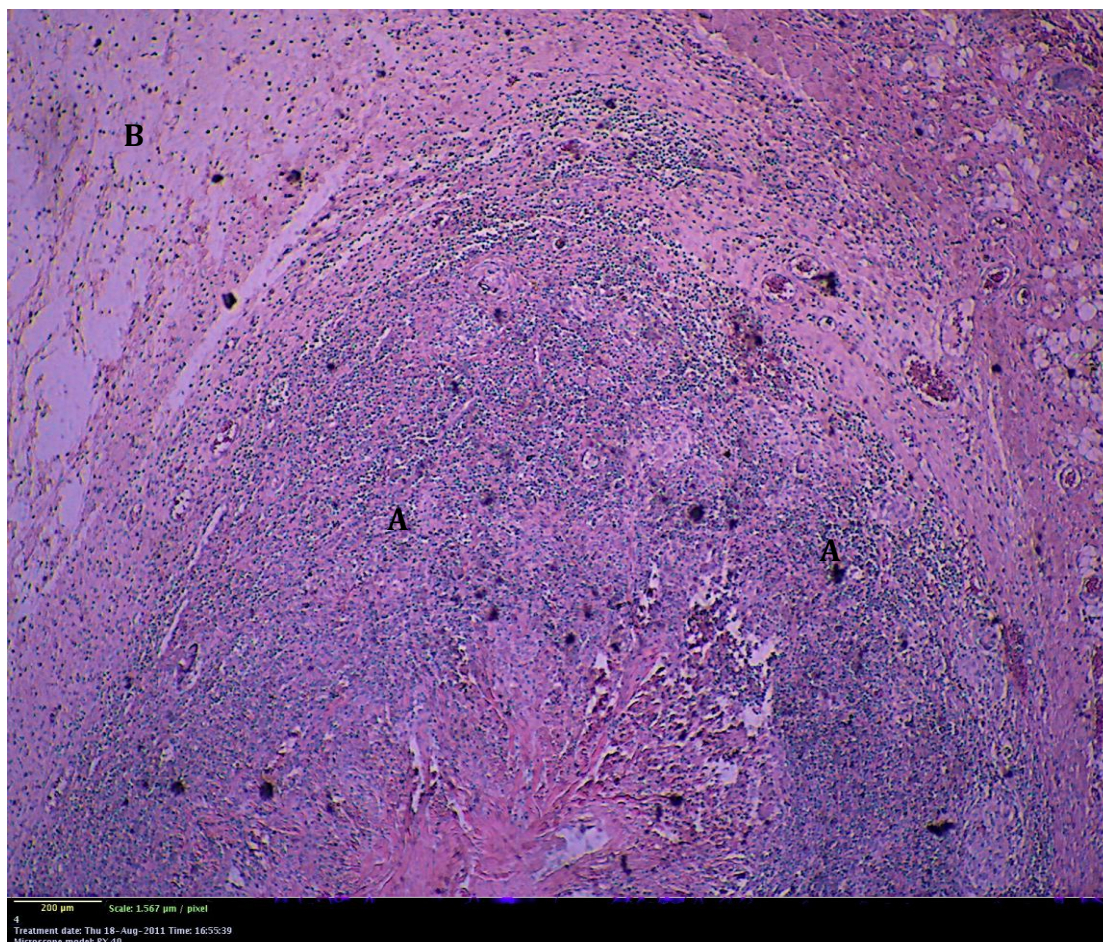


**Figura4:** Fotomicrografia do Grupo 1A. Presença de moderado infiltrado inflamatório neutrofítico (A), intenso edema (B) e moderada presença de células endoteliais intensa vascularização. Imagem observada em aumento de 4x. Alloderm® (C)

#### 2.1.1.2. Grupo 1B (controle três dias)

Após três dias de implantação no grupo controle, foram observados uma vascularização abundante, intenso infiltrado inflamatório neutrofítico, infiltrado inflamatório linfocítico moderado, presença moderada de células endoteliais e presença moderada de edema, além de igualmente presença moderada de fibroblastos. (Figura 5)



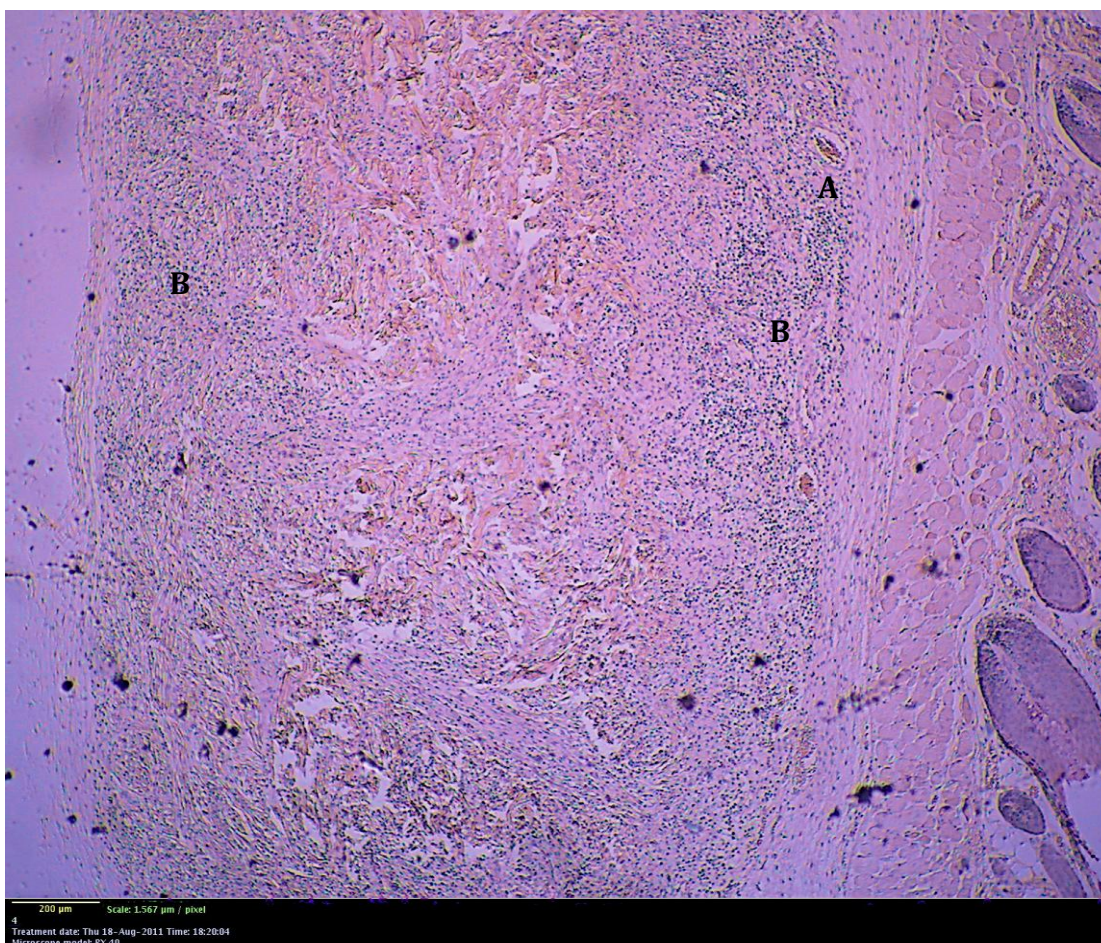


**Figura 5: Fotomicrografia do Grupo 1B. Infiltrado neutrofílico intenso (A), infiltrado linfocítico moderado, células endoteliais e edema moderados (B) e presença de fibroblastos. Imagem observada em aumento de 4x.**

#### 2.1.1.3. Grupo 1C (controle sete dias)

Após sete dias de implantação no grupo controle, observou-se uma vascularização moderada, moderado infiltrado linfocítico, presença leve de células endoteliais e leve presença de edema. Igualmente foram verificados presença moderada de fibroblastos e leve presença de infiltrado inflamatório neutrofílico. (Figura 6)

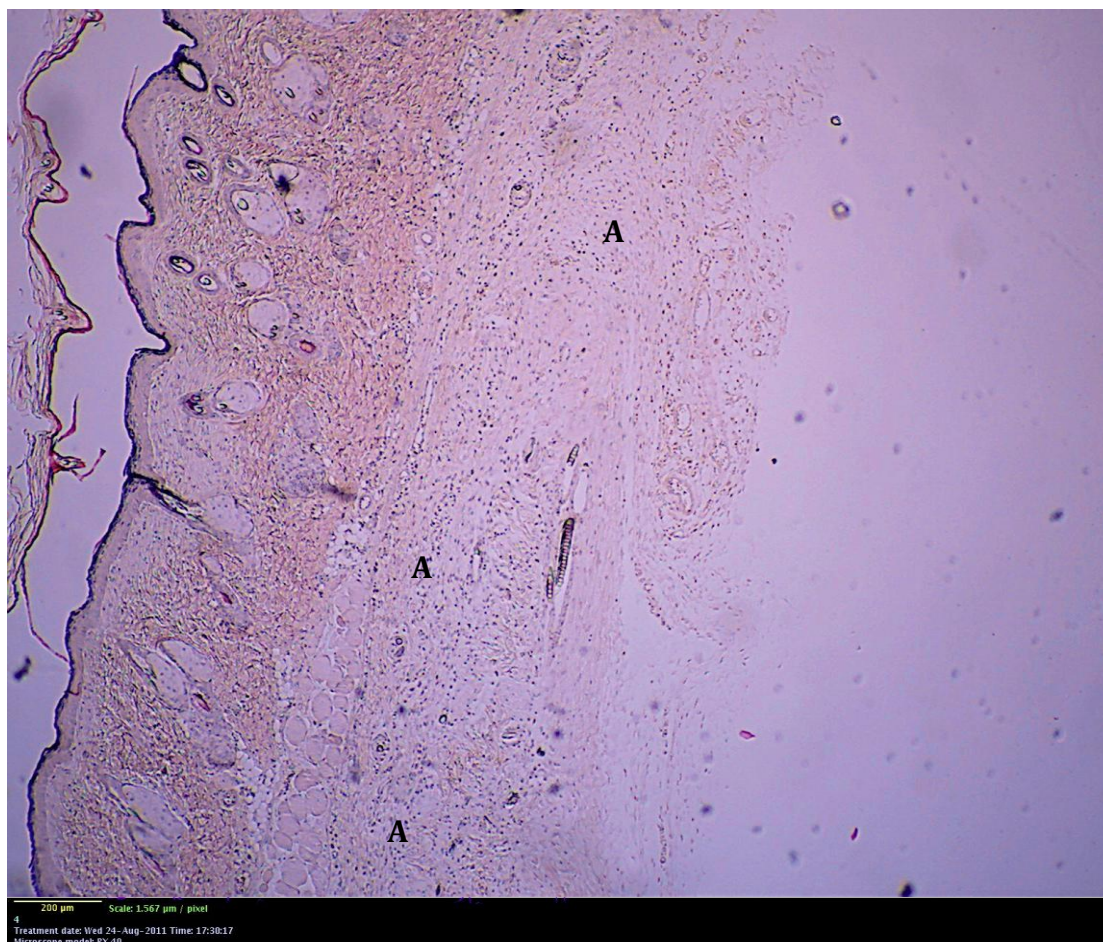




**Figura 6:** Fotomicrografia do Grupo 1C. Vascularização (A) e infiltrado linfocítico (B) moderados, edema, células endoteliais e infiltrado neutrofílico leves e presença leve de fibroblastos. Imagem observada em aumento de 4x.

#### 2.1.1.4. Grupo 1D (controle 14 dias)

Após 14 dias de implantação no grupo controle, verificaram-se vascularização leve, moderado infiltrado inflamatório linfocítico, presença leve de células endoteliais e ausência de edema, além de presença leve de fibroblastos e ausência de infiltrado inflamatório neutrofílico. (Figura 7)



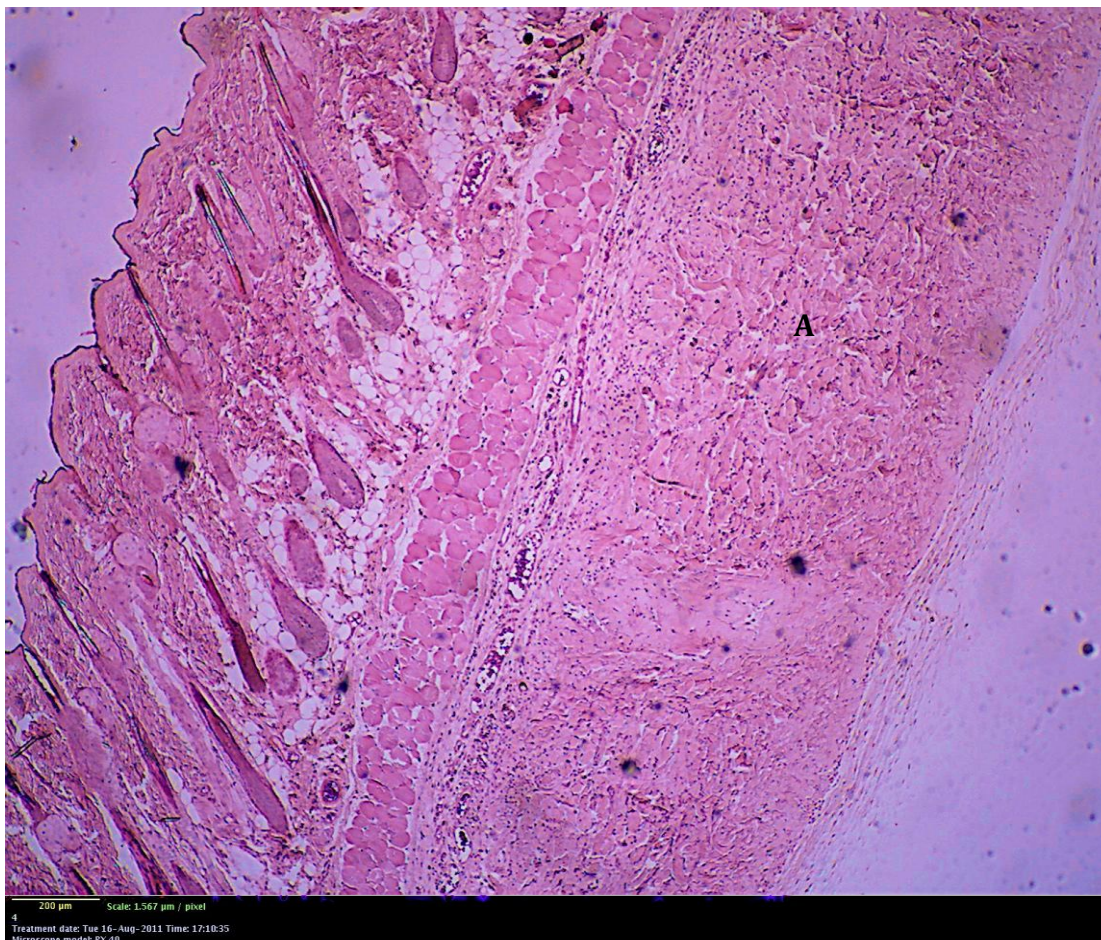
**Figura 7: Fotomicrografia do Grupo 1D. Presença leve de células endoteliais, fibroblastos e vascularização, moderado infiltrado linfocítico. Presença mais periférica de fibroblastos. Imagem observada em um aumento de 4x.**

### 2.1.2 Grupo 2 (laser)

#### 2.1.2.1. Grupo 2A (laser um dia)

Após um dia de implantação e uma aplicação de laser em uma dose total de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , observou-se vascularização moderada, leve infiltrado inflamatório linfocítico, presença leve de células endoteliais e mínima presença de edema, bem como presença leve de fibroblastos e ausência de infiltrado inflamatório neutrofítico. (Figura 8)



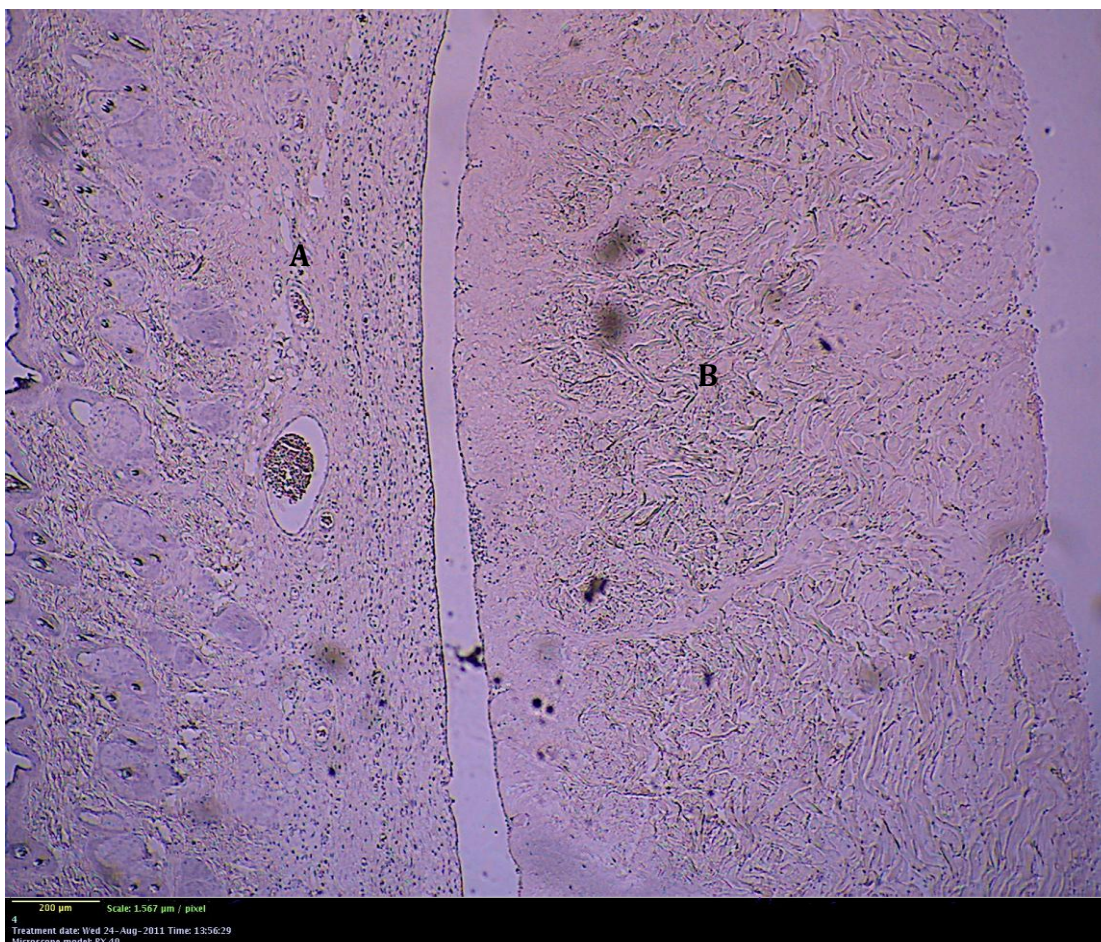


**Figura 8: Fotomicrografia do Grupo 2A. Vascularização moderada, presença leve de células endoteliais, infiltrado linfocítico e fibroblastos. Alloderm® (A). Imagem observada em um aumento de 4x.**

#### 2.1.2.2. Grupo 2B (laser três dias)

Após três dias de implantação e duas aplicações de laser em uma dose total de  $8\text{J}/\text{cm}^2$ , observou-se vascularização moderada, leve infiltrado inflamatório linfocítico, presença leve de células endoteliais e mínimo edema, além de presença leve de fibroblastos e ausência de infiltrado inflamatório neutrofítico. (Figura 9)





**Figura 9: Fotomicrografia do Grupo 2B. Vascularização (A) moderada e presença leve de infiltrado linfocítico, células endoteliais e fibroblastos. Alloderm® (B). Imagem observada em um aumento de 4x.**

#### 2.1.2.3. Grupo 2C (laser sete dias)

Após sete dias de implantação e quatro aplicações de laser em uma dose total de  $16\text{J}/\text{cm}^2$ , observou-se vascularização leve, moderado infiltrado inflamatório linfocítico, pouca presença de células endoteliais e ausência de edema, além de ausência de infiltrado inflamatório neutrofítico, com presença de moderada a intensa de fibroblastos. (Figura 10)





**Figura 10: Fotomicrografia do Grupo 2C. Presença de moderada a intensa de fibroblastos (A) e moderada de infiltrado linfocítico (B). Presença leve de vascularização e células endoteliais. Imagem observada em aumento de 4x.**

#### 2.1.2.4. Grupo 2D (laser 14 dias)

Após 14 dias de implantação e quatro aplicações de laser em uma dose total de  $16\text{J}/\text{cm}^2$ , observaram-se vascularização leve, moderado infiltrado inflamatório linfocítico, presença pequena de células endoteliais e ausência de edema, além de presença moderada de fibroblastos e ausência de infiltrado inflamatório neutrofítico. (Figura 11)





**Figura 11: Fotomicrografia do Grupo 2D. Presença moderada de infiltrado linfocítico e fibroblastos e presença leve de vascularização e células endoteliais. Presença de fibroblastos em substituição a área enxertada (A). Imagem observada em um aumento de 4x.**

## 2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 2.2.1 Variável Laser

Para análise estatística da variável laser foi utilizado o teste de Mann-Whitney, indicado na literatura para testes não paramétricos entre duas variáveis.

O grupo laser não apresentou neutrófilos em nenhum dos períodos estudados, o que inviabiliza a análise estatística.

## 2.2.1.1 Dia 1

No grupo de animais mortos um dia após o procedimento cirúrgico verificou-se presença significativamente maior de células endoteliais, vascularização e edema no grupo controle em relação ao grupo laser, sendo que este segundo apresentou linfócitos em quantidade significativamente maior que o primeiro. Os grupos não apresentaram diferença significativa de fibroblastos neste período. (Tabela 1)

**Tabela 1 – Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 1.**

Dia 1	Grupo	N	Média de rankings	P
células endoteliais	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
fibroblastos	Controle	4	3,75	0,486
	Laser	4	5,25	
	Total	8		
vascularização	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
linfócitos	Controle	4	2,5	0,029
	Laser	4	6,5	
	Total	8		
edema	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
neutrófilos	Controle	4	-	-
	Laser	4	-	
	Total	8		

## 2.2.1.2 Dia 3

Verificou-se, no grupo de animais mortos três dias após o ato cirúrgico, presença significativamente maior de células endoteliais, fibroblastos, linfócitos e edema no grupo controle em relação ao grupo laser. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos em relação à vascularização. (Tabela 2)

**Tabela 2 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 3**

Dia 3	Grupo	N	Média de ranking	P
células endoteliais	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
Fibroblastos	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
vascularização	Controle	4	5,75	0,2
	Laser	4	3,25	
	Total	8		
linfócitos	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
edema	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
neutrófilos	Controle	4	-	-
	Laser	4	-	
	Total	8		

## 2.2.1.3 Dia 7

Os animais mortos com sete dias transcorridos de pós-operatório apresentaram um número significativamente maior de fibroblastos para o grupo laser

e vascularização e edema significativamente maiores para o controle. Não se verificou diferença significativa entre os grupos em relação a linfócitos e a células endoteliais. (Tabela 3)

**Tabela 3 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 7.**

Dia 7	Grupo	N	Média de ranking	P
células endoteliais	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
Fibroblastos	Controle	4	2,5	0,029
	Laser	4	6,5	
	Total	8		
vascularização	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
Linfócitos	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
Edema	Controle	4	6,5	0,029
	Laser	4	2,5	
	Total	8		
Neutrófilos	Controle	4	-	-
	Laser	4	-	
	Total	8		

#### 2.2.1.4 Dia 14

No grupo de animais mortos após transcorridos 14 dias de pós- operatório não se verificou diferença significativa entre os grupos laser e controle para nenhum dos fatores estudados. (Tabela 4)

**Tabela 4 - Tabela com análise estatística entre grupo controle e laser referente ao dia 14.**

Dia 14	Grupo	N	Média de ranking	P
células endoteliais	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
fibroblastos	Controle	4	4,25	0,886
	Laser	4	4,75	
	Total	8		
vascularização	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
linfócitos	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
edema	Controle	4	4,5	1
	Laser	4	4,5	
	Total	8		
neutrófilos	Controle	4	-	-
	Laser	4	-	
	Total	8		

### 2.2.2 Variável Tempo

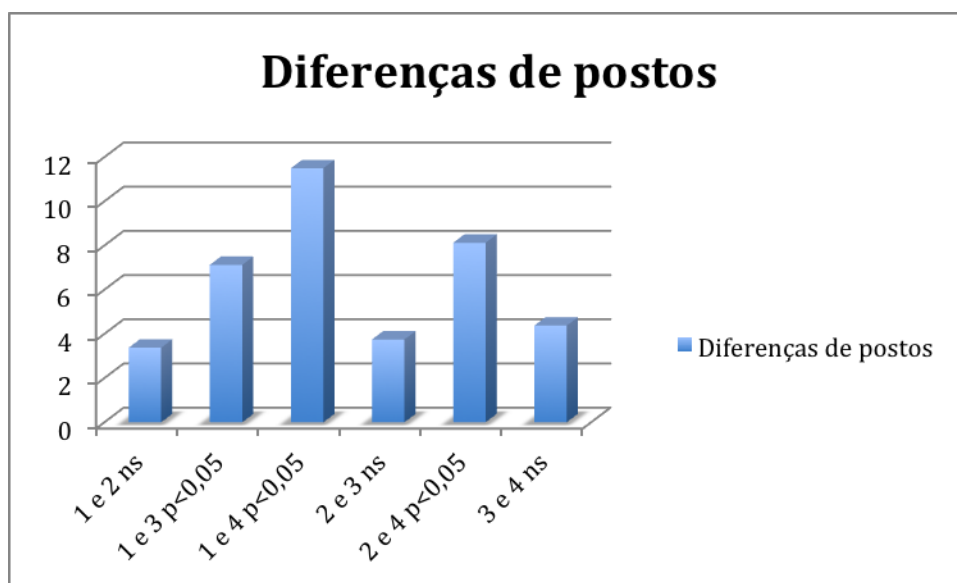
Para análise estatística da variável tempo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido daquele de Student-Newman-Keuls, utilizado para localizar entre quais períodos encontra-se a diferença significativa.

#### 2.2.2.1 Grupo Controle

##### 2.2.2.1.1 Edema



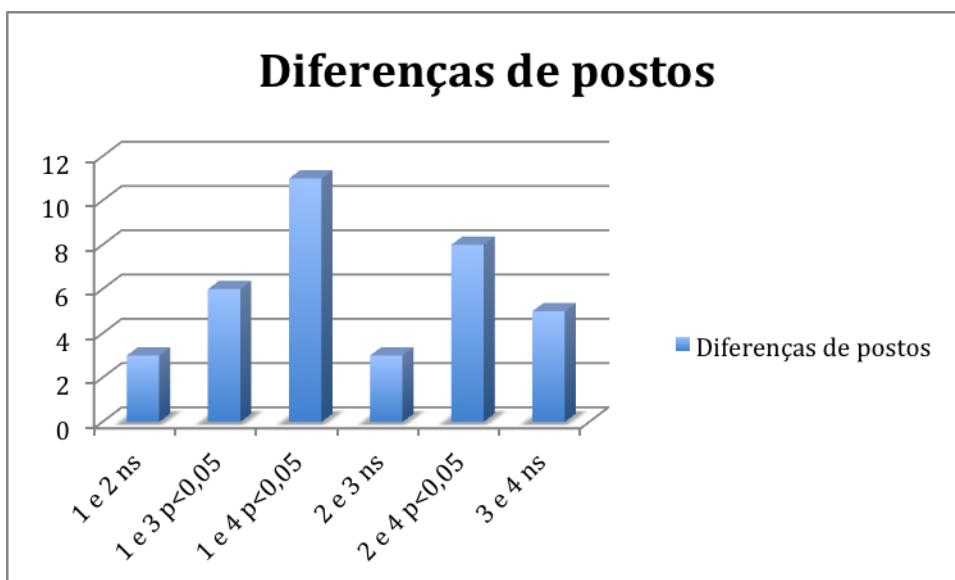
Verificou-se que o grupo morto um dia após o procedimento apresentou presença de edema significativamente superior aos grupos mortos em sete e 14 dias. O grupo morto aos três dias de pós-operatório apresentou presença de edema significativamente superior apenas ao grupo morto aos 14 dias. (Gráfico 1)



**Gráfico 1 – Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referentes ao edema do grupo controle para a variável tempo.**

#### 2.2.2.1.2 Vascularização

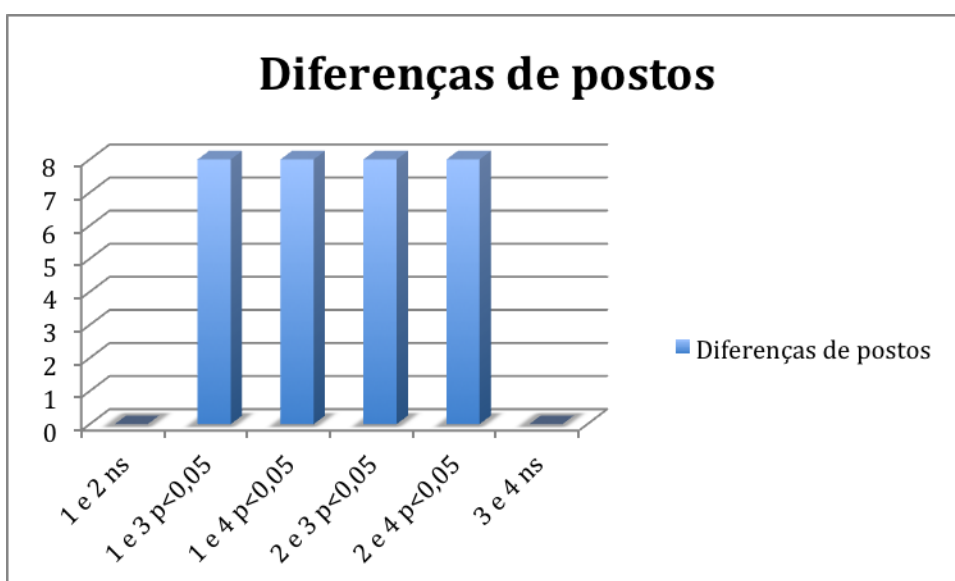
Verificou-se uma vascularização significativamente maior no grupo morto a um dia de pós-operatório em relação aos grupos mortos em sete e 14 dias, tendo o grupo de três dias também apresentado vascularização significativamente maior que o grupo de 14 dias. (Gráfico 2)



**Gráfico 2 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referentes à vascularização do grupo controle para a variável tempo.**

#### 2.2.2.1.3 Células Endoteliais

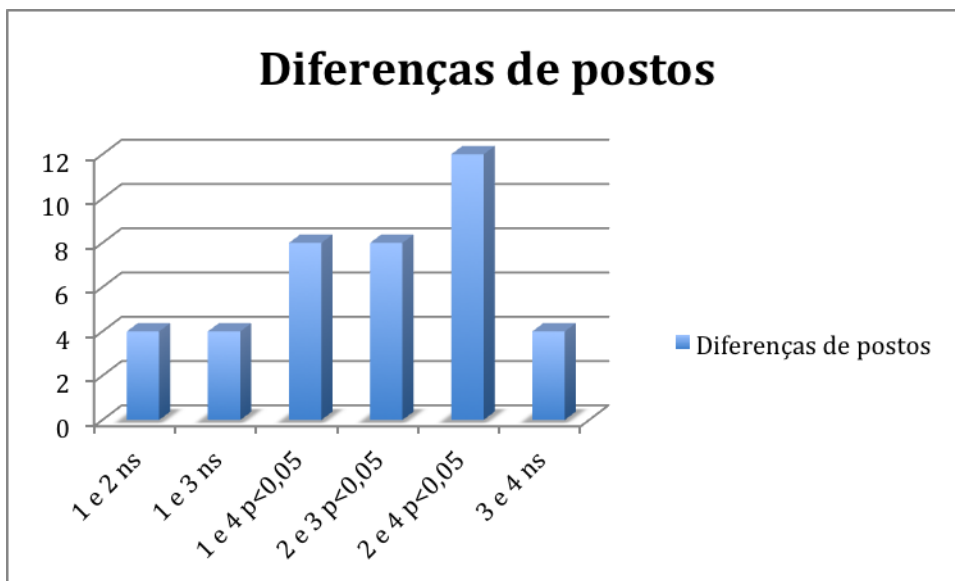
Foi observada presença significativamente maior de células endoteliais nos grupos de um e três dias em relação aos grupos de sete e 14 dias. (Gráfico 3)



**Gráfico 3 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente às células endoteliais do grupo controle para a variável tempo.**

#### 2.2.2.1.4 Neutrófilos

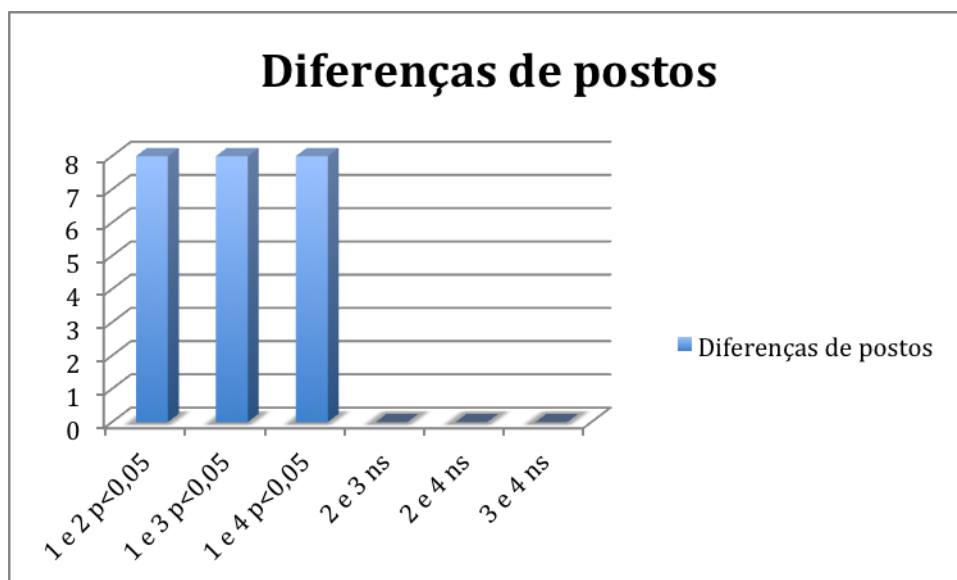
Foi verificada presença significativamente maior de neutrófilos no grupo morto a um dia em relação ao grupo morto a 14 dias, bem como no grupo morto a três dias em relação aos grupos mortos a sete e 14 dias. (Gráfico 4)



**Gráfico 4 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente às células endoteliais do grupo controle para a variável tempo.**

#### 2.2.2.1.5 Linfócitos

Verificou-se presença significativamente menor de linfócitos no grupo morto a um dia de pós-operatório em relação aos demais grupos estudados. (Gráfico 5)



**Gráfico 5 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos linfócitos do grupo controle para a variável tempo.**

#### 2.2.2.1.6 Fibroblastos

Não foi encontrada diferença significativa na presença de fibroblastos para variável tempo no grupo controle.

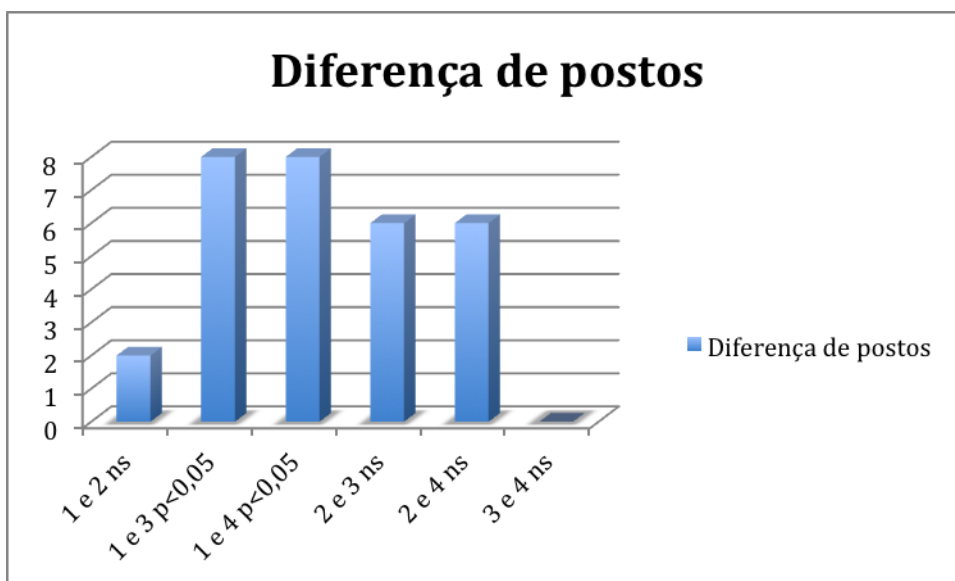
#### 2.2.2.2 Grupo Laser

##### 2.2.2.2.1 Edema

Não foi encontrado diferença significativa na presença de edema para variável tempo no grupo laser.

### 2.2.2.2.2 Vascularização

Verificou-se presença significativamente maior de vascularização em relação ao período, no grupo irradiado, apenas no grupo de um dia relacionado aos grupos de sete e 14 dias de pós-operatório. (Gráfico 6)



**Gráfico 6 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente à vascularização do grupo laser para a variável tempo.**

### 2.2.2.2.3 Células Endoteliais

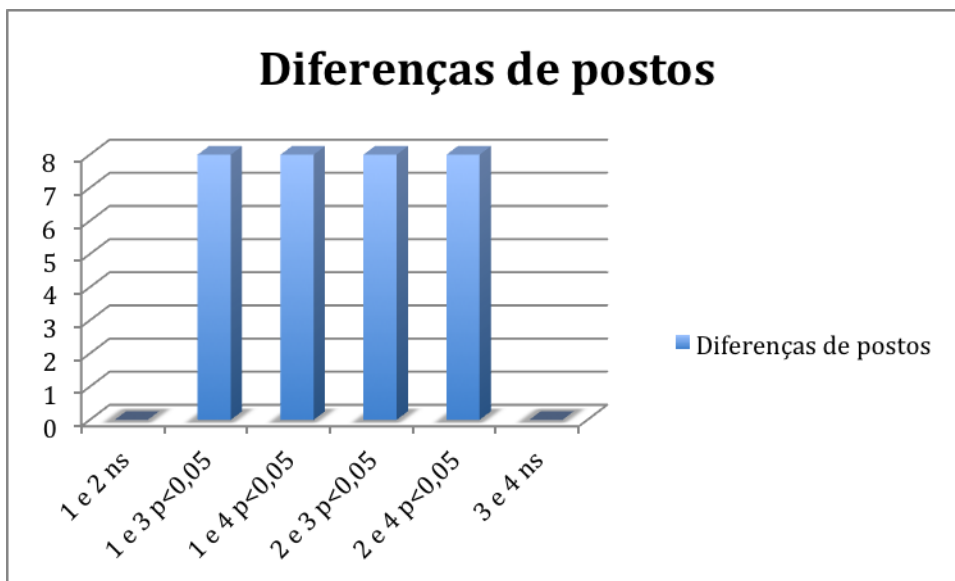
Não foi encontrada diferença significativa na presença de células endoteliais para variável tempo no grupo laser.

### 2.2.2.2.4 Neutrófilos

Não se verificou presença de neutrófilos em nenhum dos períodos estudados no grupo laser.

### 2.2.2.2.5 Linfócitos

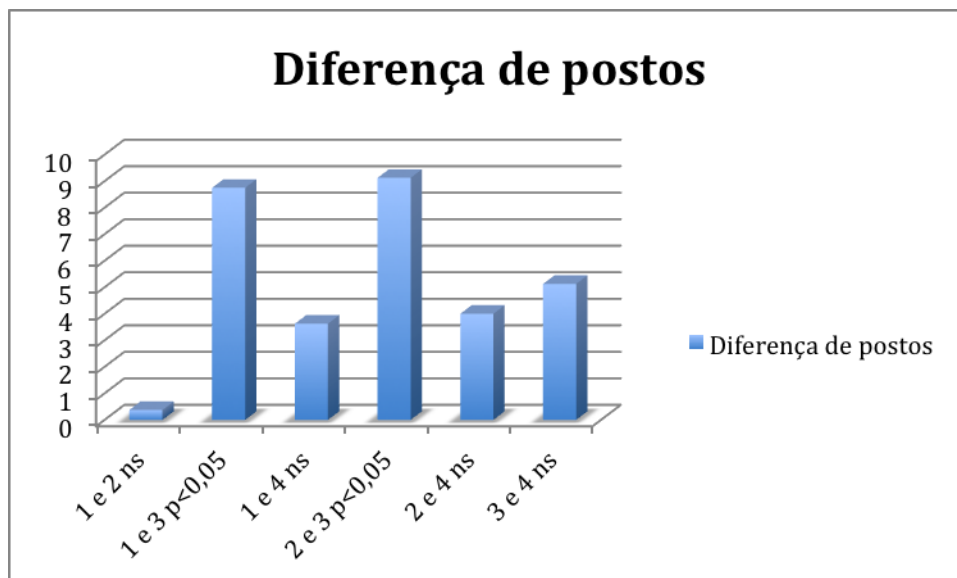
Observou-se, no grupo laser, presença significativamente maior de linfócitos nos grupos mortos a um e três dias de pós-operatório em relação aos grupos mortos a sete e 14 dias. (Gráfico 7)



**Gráfico 7 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos linfócitos do grupo laser para a variável tempo.**

### 2.2.2.2.6 Fibroblastos

Verificou-se presença significativamente maior de fibroblastos no grupo morto a sete dias de pós-operatório em relação aos grupos mortos a um e três dias. (Gráfico 8)



**Gráfico 8 - Gráfico apresentando as diferenças estatisticamente significativas referente aos fibroblastos do grupo laser para a variável tempo.**

## **DISCUSSÃO**



Inúmeras pesquisas têm sido realizadas mostrando a eficácia do Alloderm® em diferentes sítios de implantação. Contudo, não se encontra na literatura nenhum estudo sobre a eficácia da terapia laser no processo de reparo tecidual nesses sítios, conforme proposto por este trabalho.

No presente estudo foi analisada a irradiação com laser não ablativo no período pós-operatório ao enxerto do Alloderm®. O modelo utilizado nesta pesquisa foi baseado na pesquisa realizada por DUBIN et. al. (25), que avaliaram os efeitos histológicos que ocorrem após o implante de Alloderm® em ratos previamente submetidos à radioterapia.

Verificou-se presença de células inflamatórias no local do enxerto, o que não impediu a cicatrização local, a formação de fibras colágenas e a infiltração de fibroblastos no interior do tecido enxertado, o que corrobora com os achados de EPPLEY (23).

Foi utilizada uma dosagem de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  por aplicação, ficando no intervalo entre 1 e  $50\text{J}/\text{cm}^2$ , considerado intervalo em que são induzidas a maioria das reações biológicas segundo SCHINDL et al. (62). No protocolo foram realizadas quatro aplicações num intervalo de sete dias conforme MESTER, MESTER e MESTER (13).

EPPLEY (23), quando estudou a revascularização do Alloderm®, utilizou, para a morte dos animais, o cronograma de um, três, sete e 14 dias, da mesma forma que o utilizado no presente estudo.

Pesquisas com laserterapia relatam que o processo de cicatrização que envolve mediadores, componentes sanguíneos, produção de matriz extracelular e células mesenquimais é otimizado pela utilização da terapia laser (5; 49; 55).

Na presente pesquisa verificou-se presença significativamente maior de edema no grupo controle em relação ao grupo irradiado nos dias um, três e sete, assim como também presença significativamente superior de vascularização no mesmo grupo nos dias um e sete, fenômenos predominantes na inflamação aguda, o que aponta para o efeito biomodulatório da laserterapia, estando de acordo com os estudos de BENGTON et al., (49).

A resposta inflamatória aguda, particularmente observada na fase inicial, é compatível com uma reação à agressão aos tecidos causada pelo procedimento cirúrgico. O infiltrado inflamatório agudo é demonstrado, além de outros fatores, principalmente pela presença de neutrófilos, tendo sido observada nas amostras coletadas no grupo controle. No grupo com irradiação de luz de laser a reação inflamatória foi mais branda. Ao longo do tempo os exsudatos de inflamação aguda diminuíram devido à regeneração do tecido (49). Esses achados estão de acordo com os do presente estudo, que demonstraram presença de neutrófilos apenas nas amostras do grupo controle.

HONMURA et al. (63), utilizando ratos demonstraram que a irradiação com laser de baixa potência Arseneto de Gálio Alumínio inibiu a permeabilidade vascular

e o edema durante a fase aguda da inflamação. O que demonstra a capacidade biomodulatória dessa terapia e corrobora com os achados do presente estudo.

Não foram verificadas diferenças no processo cicatricial entre os grupos ao final do período experimental, o que aponta para a característica de biocompatibilidade e integração ao tecido hospedeiro que a derme acelular apresenta, conforme já relatado por BATISTA et al. (55).

Verificou-se, no presente estudo, uma presença significativamente menor de vascularização, edema e células endoteliais no grupo exposto ao laser, nos três primeiros períodos, em relação ao grupo controle. Ademais, ainda de ter se verificado presença significativamente maior de fibroblastos no interior do enxerto no grupo laser em relação ao grupo controle nos animais mortos aos sete dias. Esses achados indicam a aceleração de algumas fases do processo cicatricial provocado pela luz laser, o que corrobora com os achados de diversos autores na literatura (12; 10; 64; 49; 55).

O presente estudo mostrou uma presença de fibroblastos significativamente maior no grupo controle que no grupo laser aos três dias de pós-operatório, enquanto o grupo laser apresentou um número significativamente maior aos sete dias pós-operatório. Ao final do estudo, no grupo de 14 dias pós-operatório, não se verificou diferença significativa entre os grupos controle e laser. Observa-se que, em relação aos fibroblastos, a principal diferença entre os grupos é que no grupo laser verifica-se uma distribuição mais simétrica dos fibroblastos em toda a extensão do enxerto. Já no grupo controle, verificou-se maiores concentrações nas periferias do

enxerto. Esses achados indicam que o grupo submetido à laserterapia uma melhor incorporação do enxerto ao tecido do hospedeiro.

Ao avaliar edema, vascularização e células endoteliais em relação à variável tempo, verificou-se que no grupo controle há diferença significativa entre os grupos de um dia para os grupos de sete e 14 dias e também diferença significativa entre o grupo de três dias e o de 14 dias para edema e vascularização. Observou-se ainda, diferença significativa quando comparados os grupos de um e três dias aos grupos de sete e 14 dias. Enquanto isso, no grupo laser verificou-se diferença significativa apenas para vascularização entre o grupo de um dia e os grupos de sete e 14 dias, não sendo verificada diferença de edema entre os grupos. Esses achados apontam para uma maior exacerbação na resposta tecidual do grupo controle ao enxerto em relação ao grupo *laser* o que está de acordo com os achados de BENGTON et al. (49), que estudaram por meio de avaliação histológica e radiográfica, a reação do organismo de ratos submetidos a implante de proteína morfogenética óssea (rhBMP-2) em uma matriz de osso inorgânico e após a estimulação com luz laser de baixa potência.

O presente estudo verificou que quando comparada a presença de fibroblastos dentro dos próprios grupos em relação ao tempo, o grupo controle não apresentou diferença significativa na presença de fibroblastos entre os períodos. Em contrapartida, o grupo laser apresentou uma proliferação de fibroblastos significativamente maior no grupo de sete dias em relação aos grupos de um e três dias, o que indica que a terapia laser influenciou na proliferação de fibroblastos para

o espaço antes ocupado pelo enxerto, estando de acordo com os resultados obtidos por diversos autores consultados na literatura (49; 55)

O presente estudo não demonstrou diferença significativa em nenhum dos itens estudados entre os grupos controle e laser ao final do experimento, tendo ambos grupos apresentado uma migração de células fibroblásticas para o interior do tecido enxertado em substituição ao mesmo, sendo que no grupo experimental, verificou-se uma distribuição mais homogênea de fibroblastos em substituição a toda a área enxertada, enquanto no grupo controle esta mesma quantidade de fibroblastos foi encontrada de maneira mais desorganizada e nas porções mais periféricas do enxerto, não apresentando, ao final do período estudado, sinais inflamatórios. Tais achados indicam a biocompatibilidade do enxerto de derme acelular, o que está de acordo com os resultados de NGO et al. (20).

A biocompatibilidade do Alloderm<sup>®</sup> está aliada à manutenção de textura e elasticidade do tecido epitelial (1). Aliando essas características aos achados do presente estudo que acrescentam eficácia biomodulatória da laserterapia, fazem com que o Alloderm<sup>®</sup> seja tido como uma boa alternativa aos enxertos autógenos dispensando a necessidade de área doadora.

## **CONCLUSÕES**

O laser não ablativo Fosfeto de Índio Gálio Alumínio (685 nm) possui um efeito biomodulatório positivo no processo de reparo tecidual e foi capaz de otimizar o processo de cicatrização em torno do enxerto e de estimular a infiltração de fibroblastos para o interior do espaço antes ocupado pelo Alloderm®. Proporcionando uma distribuição uniforme dos fibroblastos em substituição ao enxerto de derme acelular.





## **BIBLIOGRAFIA**

1 - Jung SN, Chung JW, Yim YM, Kwon H. One-stage skin grafting of the exposed skull with acellular human dermis (AlloDerm). *J Craniofac Surg* 2008;19(6):1660-2.

2 - Collage RD, Rosengart MR. Abdominal wall infections with in situ mesh. *Surg Infect (Larchmt)* 2010;11(3): 311–8.

3 - Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafo W, Heimbach D, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(2):124-36.

4 - Park JB. Healing of extraction socket grafted with deproteinized bovine bone and acellular dermal matrix: histomorphometric evaluation. *Implant Dentistry.* 2010;19(4):307-13.

5 - Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg* 2006;24(4):474-9.

6 - Pinheiro AL, Cavalcanti ET, Pinheiro TI, Alves MJ, Miranda ER, De Quevedo AS, et al. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;16(4):223-6.

7 - Basford JR. Low intensity laser therapy: still not na established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1995;16(4):331-42.

8 - Pinheiro ALB, Frame JW. Laser em odontologia: seu uso atual e perspectivas futuras. *RGO Rev Gaúcha Odontol.* 1992;40(5):327-332.

9 - Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988;26(1):12-7.

- 10 - Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD, Forde DE, Overfield M, Bapna MS. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med.* 1989;9(1):50-8.
- 11 - Gordjestani M, Dermaut L, Thierens H. Infrared laser and bone metabolism: a pilot study. *Int Oral Maxillofac Surg.* 1994;23(1):54-6.
- 12 - Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122(4):532-5.
- 13 - Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5(1):31-9.
- 14 - Croce MA, Silvestri C, Guerra D, Carnevali E, Boraldi F, Tiozzo R, et al. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. *J Biomater Appl.* 2004;18(3):209-22.
- 15 - Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin: current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* 2001;2(5):305-13.
- 16 - Sefton MV, Woodhouse K A. Tissue engineering. *J Cutan Med Surg.* 1998;3 Suppl 1:S18-23.
- 17 - Hafemann B, Ensslen S, Erdmann C, Niedballa R, Zühlke A, Ghofrani K, et al. Use of collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns.* 1999;25(5):373-84.
- 18 - Eaglstein WH, Iriundo M, Laszlo K. A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds: a clinical experience. *Dermatol Surg.* 1995;21(10):839-43.
- 19 - Eppley BL. Experimental assessment of the revascularization of acellular human dermis for soft-tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(3):757-62.

20 - Ngo MD, Aberman HM, Hawes ML, Choi B, Gertzman AA. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in an in vivo model for incisional hernia repair. *Cell Tissue Bank* 2011;12(2):135-45.

21 - Bachman S, Ramshaw B. Prosthetic material in ventral hernia repair: how do I choose? *Surg Clin North Am.* 2008;88(1):101-12.

22 - De Vries HJ, Mekkes JR, Middelkoop E, Hinrichs WL, Wildevuur CR, Westerhof W. Dermal substitutes for full-thickness wounds in a one-stage grafting model. *Wound Repair Regen.* 1993;1(4):244-6.

23 - Eppley BL. Revascularization of acellular human dermis (Alloderm) in subcutaneous implantation. *Aesthetic Surg J.* 2000;20(4):291-5.

24 - Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A. Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplantation.* 1995;60(1):1-9.

25 - Dubin MG, Feldman M, Ibrahim HZ, Tufano R, Evans SM, Rosenthal D, et al. Allograft dermal implant (AlloDerm) in a previously irradiated field. *Laryngoscope.* 2000;110(6):934-7.

26 - Erlich HP, Trelstad RL, Fallon JT. Dermal vascular patterns in response to burn or freeze injury in rats. *Exp Mol Pathol*;1981(34):281-9.

27 - Eberli D, Rodriguez S, Atala A, Yoo JJ. In vivo evaluation of acellular human dermis for abdominal wall repair. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93:1527-38.

28 - Tark KC, Chung S, Shin KS, Park BY. Skin flap prefabrication using acellular dermal matrix and cultured keratinocytes in a porcine model. *Ann Plast Surg.* 2000;44(4):392-7.

29 - Mizuno H, Takeda A, Uchinuma E. Creation of an acellular dermal matrix from frozen skin. *Aesthetic Plast Surg.* 1999;23(5):316-22.

30 - Lattari V, Jones LM, Varcelotti JR, Latenser BA, Sherman HF, Barrette RR. The use of permanent dermal allograft in full-thickness burns of the hand and foot: a report of three cases. *J Burn Care Rehabil.* 1997;18(2):147-155.

31 - Menon NG, Rodriguez ED, Byrnes CK, Girotto JA, Goldberg NH, Silverman RP. Revascularization of human acellular dermis in full-thickness abdominal wall reconstruction in the rabbit model. *Ann Plast Surg.* 2003;50(5):523-7.

32 - Sengor A, Aydin O, Mola F, Gürbüz Y. Evaluation of alloderm and autologous skin in quadriceps muscles of rats for injection laryngoplasty. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(2):107-12.

33 - Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Alasia ST, Richiardi P. Anomalous expression of HLA class II molecules on keratinocytes and fibroblasts in hypertrophic scars consequent to the thermal injury. *Clin Exp Immunol.* 1990;82(2):350-4.

34 - Blanck G, Lok M, Kok K, Downie E, Korn JH, Strominger JL. Gamma-interferon induction of HLA class II mRNAs in dermal fibroblasts studied by RNase protection analysis. *Hum Immunol.* 1990;29(2):150-6.

35 - Guthy EA, Billote JB, Burke JF. Skin as an organ transplant. A critical re-evaluation of the allografts. *Eur J Plast Surg.* 1974;2(4):263-80.

36 - Raj A, Sayal A, Rathore PK, Meher R. Sutureless tympanoplasty using acellular dermis. *Am J Otolaryngol.* 2011;32(2):96-9.

37 - Harris RJ. Root coverage with connective tissue with partial thickness double pedicle graft and an acellular dermal matrix graft: a clinical and histological evaluation of a case report. *J Periodontol.* 1998;69(11):1305-11.

38 - Dodge JR, Henderson R, Greenwell H. Root coverage without a palatal donor site using an acellular dermal graft. *Periodont Insights.* 1998;5(4):5-8.

39 - Harris RJ. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20(1):51-9.

40 - Shulman J. Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingival. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1996;8(2):201-8.

41 - Haeri A, Parsell D. Creeping attachment: autogenous graft vs dermal matrix allograft. *Compend Contin Educ Dent*. 2000;21(9):725-9.

42 - Callan DP. Use of acellular dermal matrix allograft material in dental implant treatment. *Dental Surg Products*. 1996;1:14-7.

43 - Callan DP, Silverstein LH. An acellular dermal matrix allograft substitute for palatal donor tissue. *Postgrad Dent*. 1996;3(4):14-21.

44 - Shulman J. A previously unreported surgical technique utilizing five different grafting materials to successfully achieve simultaneous alveolar regeneration and closure of a large oronasal defect. *J Oral Implantol*. 1998;24(4):206-13.

45 - Brugnera Júnior A, Pinheiro ALB. *Lasers na odontologia moderna*. São Paulo: Pancast, 1998.

46 - Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42(5):302-6.

47 - Pöntinen PJ. *Low level laser therapy as a medical treatment modality*. Tampere: Art Urpo, 1992.

48 - Brugnera Júnior A, Santos AEC, Bologna ED, Ladalardo TCCGP. *Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica*. São Paulo: Santos, 2003.

- 49 – Bengtson AL, Bengtson NG, Bengtson CRG, Mendes FM, Pinheiro FL. Histological and radiographic evaluation of the muscle tissue of rats after implantation of bone morphogenic protein (rhBMP-2) in a scaffold of inorganic bone and after stimulation with low-power laser light. *Indian J Dent Res.* 2010;21(3):420-4.
- 50 - Hallman HO, Basford JR, O'Brien JF, Cummins LA. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter “in vitro” replication of human fibroblasts? *Lasers Surg Med.* 1988;8(2):125-9.
- 51 - In de Braekt MMH, Alphen FAM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC . Effect of low-level laser therapy on wound healing after palatal surgery in Beagle dogs. *Lasers Surg Med.* 1991;11(5):462-70.
- 52 - Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zetterqvist L, Rydén H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing: an experimental study in rats. *Swed Dent J.* 1994;18(1-2):29-34.
- 53 - Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med.* 1997; 20(4):426-32.
- 54 - Longo L, Evangelista S, Tinacci G, Sesti AG. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (GaAlAs) 904 nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg Med.* 1987;7(5):444-7.
- 55 - Baptista J, Bussadori SK, Fernandes KPS, Ferrari RAM, Martins MD, Pavesi VCS, et al. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):11-7.
- 56 - Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989;56(5):691-704.

- 57 - Van Breugel HHFI, Dop Bär PR. Power density and exposure time of HeNe laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1992;12(5):528-37.
- 58 - Franks Y. Low level laser therapy. *J Com Nurs.* 1999;13(4):14-22.
- 59 - Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med.* 2000;27(5):427-37.
- 60 - Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;30(5):365-9.
- 61 - Leamy L. Heritability of osteometric traits in a randombred population of mice. *J Hered.* 1974;65(2):109-20.
- 62 - Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000;48(5):312-26.
- 63 - Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med.* 1992;12(4):441-9.
- 64 - Medrado AR, Pugliese LS, Reis SR, Andrade ZA.. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-44.

## **ANEXO A**





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 130/11 – CEUA

Porto Alegre, 06 de outubro de 2011.

Senhora Pesquisadora:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00241 intitulado: **“Avaliação histológica do reparo em enxertos de derme acelular, estimulado por laser não-ablativo”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.  
Profa. Marília Gerhardt de Oliveira  
FO  
Nesta Universidade

PUCRS

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## **ANEXO B**

**Lei no 11.794, de 08.10.2008**

Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA - Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

**CAPÍTULO I DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES** Art. 1o A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei. § 1o A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a: I – estabelecimentos de ensino superior; II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica. § 2o São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio. § 3o Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária. Art. 2o O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata, observada a legislação ambiental. Art. 3o Para as finalidades desta Lei entende-se por: I – filo Chordata: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único; II – subfilo Vertebrata: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral; III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas; IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental. Parágrafo único. Não se considera experimento: I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite; II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro; III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

**CAPÍTULO II DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA** Art. 4o Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Art. 5o Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica; II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica; III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa; IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário; V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações; VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa; VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em

andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8o desta Lei; VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs; IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno; X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei. Art. 6o O CONCEA é constituído por: I – Plenário; II – Câmaras Permanentes e Temporárias; III – Secretaria-Executiva. § 1o As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno. § 2o A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia. § 3o O CONCEA poderá valer-se de consultores ad hoc de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos. Art. 7o O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por: I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados: a) Ministério da Ciência e Tecnologia; b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; c) Ministério da Educação; d) Ministério do Meio Ambiente; e) Ministério da Saúde; f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB; h) Academia Brasileira de Ciências; i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental; l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica; II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1o Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério. § 2o O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3o Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

### CAPÍTULO III DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs Art. 8o

É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs. Art. 9o As CEUAs são integradas por: I – médicos veterinários e biólogos; II – docentes e pesquisadores na área específica; III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento. Art. 10. Compete às CEUAs: I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA; II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável; III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA; IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA; V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros; VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras. § 1o Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a

irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis. § 2o Quando se configurar a hipótese prevista no § 1o deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei. § 3o Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA. § 4o Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento. § 5o Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

#### CAPÍTULO IV DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei. § 1o (VETADO) § 2o (VETADO) § 3o (VETADO) Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA. Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA. § 1o A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição. § 2o Na hipótese prevista no § 1o deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle. Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA. § 1o O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento. § 2o Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se. § 3o Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais. § 4o O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. § 5o Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas. § 6o Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA. § 7o É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas. § 8o É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa. § 9o Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência. § 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as

condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão. Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

**CAPÍTULO V DAS PENALIDADES** Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de: I – advertência; II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais); III – interdição temporária; IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico; V – interdição definitiva. Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA. Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas: I – advertência; II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais); III – suspensão temporária; IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei. Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator. Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal. Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

**CAPÍTULO VI DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS** Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão: I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei; II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do caput do art. 5º desta Lei. Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos: I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA. Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia. Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias. Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação. Art. 27. Revoga-se a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979. Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

**LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA Tarso Genro Reinhold Stephanes José Gomes Temporão Miguel Jorge Luiz Antonio Rodrigues Elias Carlos Minc Publicada no D.O.U. de 09/10/2008, Seção I, Pág. 1.**

## **ANEXO C**

**RESOLUÇÃO Nº 714, DE 20 DE JUNHO DE 2002**

*Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.*

O CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA - CFMV, no uso da atribuição que lhe são conferidas pelo art. 16, alínea "f" da Lei no 5.517, de 23 de outubro de 1968 e,

considerando a crescente preocupação da sociedade quanto à eutanásia dos animais e a necessidade de uniformização de metodologias junto à classe médico-veterinária;

considerando a diversidade de espécies envolvidas e a multiplicidade de métodos aplicados;

considerando que a eutanásia é um procedimento amplamente utilizado e necessário, e que sua aplicação pressupõe a observância de parâmetros éticos específicos,

**R E S O L V E:**

**Art. 1º** Instituir normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais.

**CAPÍTULO I DAS NORMAS GERAIS**

**Art. 2º** A eutanásia deve ser indicada quando o bem-estar do animal estiver ameaçado, sendo um meio de eliminar a dor, o distresse ou o sofrimento dos animais, os quais não podem ser aliviados por meio de analgésicos, de sedativos ou de outros tratamentos, ou, ainda, quando o animal constituir ameaça à saúde pública ou animal, ou for objeto de ensino ou pesquisa.

Parágrafo único. É obrigatória a participação do médico veterinário como responsável pela eutanásia em todas as pesquisas que envolvam animais.

**Art. 3º** O médico veterinário responsável pela eutanásia deverá: I – possuir prontuário com o(s) método(s) e técnica(s) empregados, mantendo estas informações disponíveis para utilização dos CRMVs;

II – atentar para os riscos inerentes ao método escolhido para a eutanásia;

III – pressupor a necessidade de um rodízio profissional, quando houver rotina de procedimentos de eutanásia, com a finalidade de evitar o desgaste emocional decorrente destes procedimentos;

IV – permitir que o proprietário do animal assista à eutanásia, sempre que este assim o desejar.

**Art. 4º** Os animais deverão ser submetidos à eutanásia em ambiente tranquilo e adequado, longe de outros animais e do alojamento dos mesmos.

**Art. 5º** A eutanásia deverá ser realizada segundo legislação municipal, estadual e federal, no que se refere à compra e armazenamento de drogas, saúde ocupacional e a eliminação de cadáveres e carcaças.

**Art. 6º** Quando forem utilizadas substâncias químicas que deixem ou possam deixar resíduos é terminantemente proibida a utilização da carcaça para alimentação.

**Art. 7º** Os procedimentos de eutanásia, se mal empregados, estão sujeitos à legislação federal de crimes ambientais.

**CAPÍTULO II DOS PROCEDIMENTOS**

**Art. 8º** A escolha do método dependerá da espécie animal envolvida, dos meios disponíveis para a contenção dos animais, da habilidade técnica do executor, do número de animais e, no caso de experimentação animal, do protocolo de estudo, devendo ainda o método ser:

I – compatível com os fins desejados;

II – seguro para quem o executa, causando o mínimo de estresse no operador, no



observador e no animal;

III – realizado com o maior grau de confiabilidade possível, comprovando-se sempre a morte do animal, com a declaração do óbito pelo médico veterinário.

**Art. 9o** Em situações onde se fizer necessária a indicação da eutanásia de um número significativo de animais, como por exemplo, rebanhos, Centros de Controle de Zoonoses, seja por questões de saúde pública ou por questões adversas aqui não contempladas, a prática da eutanásia deverá adaptar-se a esta condição, seguindo sempre os métodos indicados para a espécie em questão.

**Art. 10.** Os procedimentos de eutanásia são de exclusiva responsabilidade do médico veterinário.

**Art. 11.** Nas situações em que o objeto da eutanásia for o ovo embrionado, a morte do embrião deverá ser comprovada antes da manipulação ou eliminação do mesmo.

### CAPÍTULO III DOS MÉTODOS RECOMENDADOS

**Art. 12.** Os agentes e métodos de eutanásia, recomendados e aceitos sob restrição, seguem as recomendações propostas e atualizadas de diversas linhas de trabalho consultadas, entre elas a Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA), estando adequados à realidade nacional, e encontram-se listados, por espécie, no anexo I desta Resolução.

§ 1o Métodos recomendados são aqueles que produzem consistentemente uma morte humanitária, quando usados como métodos únicos de eutanásia.

§ 2o Métodos aceitos sob restrição são aqueles que, por sua natureza técnica ou por possuírem um maior potencial de erro por parte do executor ou por apresentarem problemas de segurança, podem não produzir consistentemente uma morte humanitária, ou ainda por se constituírem em métodos não bem documentados na literatura científica. Tais métodos devem ser empregados somente diante da total impossibilidade do uso dos métodos recomendados constantes do anexo I desta Resolução.

**Art. 13.** Outros métodos de eutanásia não contemplados no ANEXO I poderão ser permitidos, desde que realizados sob autorização do CRMV ou CFMV.

**Art. 14.** São considerados métodos inaceitáveis: I - Embolia Gasosa; II - Traumatismo Craniano; III - Incineração in vivo;

IV - Hidrato de Cloral (para pequenos animais); V – Clorofórmio; VI - Gás Cianídrico e Cianuretos; VII – Descompressão;

VIII – Afogamento;

IX - Exsanguinação (sem sedação prévia);

X - Imersão em Formol;

XI - Bloqueadores Neuromusculares (uso isolado de nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e todos os curarizantes);

XII - Estricnina.

Parágrafo único. A utilização dos métodos deste artigo constitui-se em infração ética.

**Art. 15.** Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Méd.Vet. Benedito Fortes de Arruda Presidente CRMV/GO no 0272

Méd.Vet. José Euclides Vieira Severo Secretário-Geral CRMV/RS no 1622

Publicada no DOU de 21-06-2002, Seção 1, pág. 201.

## ANEXO I (1)

<b>Espécie</b>	<b>Recomendados</b>	<b>Aceitos sob restrição</b>
Anfíbios (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sulfonato de triclaína (tms, ms222), hidrocloreto de benzocaína	Pistola de ar comprimido, pistola, atordoamento e decapitação
Animais selvagens de vida livre (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sevofluorano	CO2, pistola comprimido, armadilhas cientificamente) de ar pistola, (testadas
Animais de zoológicos (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sevofluorano	CO2, pistola de comprimido, pistola ar
Aves (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, anestésicos inaláveis, pistola de ar comprimido	CO2, N2, argônio, deslocamento cervical, decapitação, percussão
Cães	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*	Pistola, pistola de ar comprimido, halotano, isofluorano, sevofluorano, barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis seguido de anestésico local na cisterna magna
Equídeos	Barbitúricos* associados ou não ao éter gliceril guaiacol e/ou sulfato de magnésio	Pistola, pistola de ar comprimido, barbitúricos seguidos de anestésico local na cisterna magna
Coelhos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sevofluorano	deslocamento cervical (<1kg), decapitação

(1) O anexo I está com a redação dada pelo art. 6º da Resolução no 876, de 15-02-2008, publicada no DOU de 25-02-2008, Seção 1, pág. 100.

Gatos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*	Halotano, isofluorano, sevofluorano
Mamíferos marinhos	Barbitúricos, hidrocloreto de etorfina	Pistola (cetáceos <4m de comprimento)
Peixes (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sevofluorano, triclaína, hidrocloreto de benzocaine	Decapitação, da medula deslocamento percussão secção espinhal, cervical,
Primatas não-humanos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*	Halotano, isofluorano, sevofluorano
Répteis (de acordo com a espécie)	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis	Pistola de ar comprimido, pistola, decapitação e secção da medula espinhal, percussão
Roedores e outros pequenos mamíferos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*, halotano, isofluorano, sevofluorano	Deslocamento cervical (ratos <200g), percussão, decapitação, CO2
Ruminantes	Barbitúricos* associados ou não à éter gliceril guaiacol e/ou sulfato de magnésio*	Pistola, pistola de ar comprimido, barbitúricos seguidos de anestésico local na cisterna magna
Suínos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*	Pistola, pistola de ar comprimido
Visões, raposas, e outros mamíferos criados para extração de pele e anexos	Barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis*	Halotano, isofluorano, sevofluorano

\* Em todos os casos, para todas as espécies, os barbitúricos ou anestésicos gerais devem ser administrados por via intravenosa e apenas na impossibilidade desta, por via intraperitoneal, em dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, pode-se complementar com o cloreto de potássio associado ou não ao bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa.