

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

**Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e Droga  
Fotossensibilizadora no Processo de Cicatrização.**

**Janine Cuzzolin e Silva**

Dissertação de Mestrado  
apresentada no Programa de Pós-  
Graduação em Bioengenharia, como  
complementação dos créditos  
necessários para obtenção do título  
de Mestre em Engenharia  
Biomédica.

São José dos Campos, SP

2003

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

**Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e Droga  
Fotossensibilizadora no Processo de Cicatrização.**

***Janine Cuzzolin e Silva***

Dissertação de Mestrado apresentada no  
Programa de Pós – Graduação em  
Bioengenharia, como complementação  
dos créditos necessários para obtenção  
do título de Mestre em Engenharia  
Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cláudio  
Tedesco.

São José dos Campos, SP

2003

S58a

Silva, Janine Cuzzolin  
Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e  
Droga Fotossensibilizadora no Processo de  
Cicatrização/Janine Cuzzolin Silva; São José dos  
Campos: UniVap, 2003.  
100p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da  
Universidade do Vale do Paraíba, 2003

1. Laser de Baixa Potência 2. Terapia Fotodinâmica 3.  
Cicatrização I. Tedesco, Cláudio, Orient. II. Título

CDU.616-003.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a  
reprodução total ou parcial desta Dissertação, por processo fotocopador  
ou transmissão eletrônica.

Aluno:

Data:

Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e Droga  
Fotossensibilizadora no Processo de Cicatrização.

**Janine Cuzzolin e Silva**

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Pacheco Soares (UNIVAP)\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco (UNIVAP)\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dra. Edna Maria do Carmo Araújo (UNESP)\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D – UNIVAP  
São José dos Campos, agosto de 2003.

## **Dedicatórias**

Ao meu esposo, ***Irany Laraia Júnior***, pelo carinho, orientação e indispensável estímulo nessa fase de formação profissional e realização desse trabalho, e por toda compreensão pela minha ausência nesse período.

Aos meus pais, **Milton e Demair**, por todo e tanto sacrifício dedicado à minha felicidade, conseguiram por seus próprios méritos, a me educar de forma que compreendesse a importância do *amor na vida*, a quem devo o meu caráter.

Aos meus irmãos, presentes de Deus, **Rudolf e Victor**, que sempre me apoiaram para realização das minhas conquistas.

A toda **minha família**, que tanto torceu para um bom desempenho desse estudo, e por estarem sempre presentes.

### ***Agradecimentos Especiais***

Ao **Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco**, orientador e amigo, meus sinceros agradecimentos pelo aprendizado, confiança e pleno apoio na realização desse trabalho.

A **Profª. Selma Kuckelhauf**, do Laboratório de Genética, da Universidade de Brasília (UNB), pela amizade e constante disponibilidade, e por toda a ajuda na construção dos meus conhecimentos em histologia.

## **Agradecimentos**

A minha “irmã” ***Cristiane Martins***, que esteve sempre presente contribuindo com atenção e carinho na realização desse trabalho.

Ao ***Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco***, Diretor do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pelas oportunidades oferecidas.

Ao ***Prof. Ms. Evandro Sauro***, coordenador do curso de Fisioterapia de Lins, pela receptividade e oportunidade de realização deste trabalho na Instituição.

Ao **Prof. Luis Ferreira Neto**, professor da Faculdade Salesianas de Lins, pela receptividade.

Ao **Cristiano**, responsável pelo Laboratório de Anatomia e Biotério da Faculdade de Lins, pela colaboração na realização da pesquisa experimental.

Ao **Sr. Demerval Peixoto**, técnico responsável pelo Laboratório de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Lins, UNIMEP, pela colaboração.

A **Rosângela Taranger**, coordenadora das Bibliotecas (UNIVAP), pela atenção e competência, na organização do trabalho.

A **Rebeca**, bibliotecária do IP&D, pelas orientações e solicitude na contribuição de referências.

Ao **Prof. Luciano Paulino da Silva**, do Laboratório de Morfologia, da Universidade de Brasília (UNB), pela colaboração..

Ao meu sogro, **Prof. Irandy Laraia**, pela correção gramatical e pela gentileza do seu ser.

As colegas **Cláudia e Ivone**, da secretaria do IP&D, pela atenção e orientação durante o curso.

Aos **colegas de Mestrado**, em especial **Cecília de Azevedo Luiz**, pela amizade construída ao longo do curso.





“Sabedoria é ter consciência que o limite para o apredizado está vinculado ao tempo que impera poderoso sobre o nosso corpo físico...

Quanto à alma ... é apenas ... não é individual.

É parte de toda Divindade.”

***Irany Laraia Júnior***

## **RESUMO**

### **Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e Droga Fotossensibilizadora no Processo de Cicatrização**

Uma enorme variedade de terapias tem surgido na medida que ocorrem avanços nas áreas de aplicações tecnológicas. Sabe-se que o Laser de Baixa Potência favorece a cicatrização tissular. A potencial aplicação da TFD na cicatrização e formação de cicatriz não tem sido bem explorado. Foi feito um estudo experimental, de abordagem qualitativa, que avaliou através de análises histológicas, os efeitos do Laser de Baixa Potência InGaAlP (685nm; 35mW) isolado e associado com um Fármaco Fotossensibilizante (FS) derivado da ftalocianina, e uma Base Gel Tensora (BG) no processo de cicatrização de feridas cutâneas padronizadas em ratos. Sessenta animais foram divididos em 6 grupos: Grupo Controle; Grupo BG; Grupo FS; Grupo Laser; Grupo Laser + FS; Grupo Laser + FS + BG. O protocolo de tratamento nos grupos experimentais foi efetuado diariamente por sete dias. Os animais foram sacrificados no oitavo dia após a cirurgia. O espécime contendo a ferida de cada animal foi removido e preparado para análises histológicas seguindo técnica convencional. As lâminas foram coradas com H&E e Tricrômio de Masson (para avaliação de colágeno) e submetidas a análises por Microscopia Óptica de Luz. Observou-se que os animais dos grupos experimentais (Laser; FS; Laser + FS; Laser + FS + BG) apresentaram uma maior quantidade de colágeno em relação ao grupo controle e ao grupo BG e maior reepitelização. A remodelação do tecido conjuntivo foi mais incidente nos grupos Laser + FS e

Grupo Laser + FS + BG. A TFD não causou nenhuma inibição e nenhum prejuízo no processo de cicatrização.

Palavras-chaves: Laser de Baixa Potência; Terapia Fotodinâmica; Fotossensibilizadores; Processo de Cicatrização

## **ABSTRACT**

### **Evaluation of the Use of Low Level Laser Therapy and Photosensitizer Drugs in the Healing Process**

An enormous variety of therapies has been surging as a consequence of the advances in the fields of technological applications. It's known that Low Level Laser Therapy contributes to tissular healing. The potential application of PDT in healing and scar formation has not been well explored. The study was experimental, with a qualitative approach and evaluated through histological analysis the effects of isolated Low Level Laser InGaAlP (685nm; 35mW) and associated with a Photosensitizer Drug (PD) derivated from Phthalocyanine and a Tensor Gel Base (GB) in the process of healing of standardized cutaneous wounds in mice. Sixty animals were divided in six groups: Control Group; GB Group; PD Group; Laser Group; Laser Group + PD; Laser Group + PD + GB. The protocol of treatment in the experimental groups was daily performed during seven days. The animals were sacrificed in the eighth day after surgery. The specime with the wound of each animal was removed and prepared to histological analysis following convencional techniques. The blades were stained with H&E and Masson's Trichrome (for collagen evaluation) and submitted to analysis through light optical microscopy. It was observed that the animals of experimental groups (laser; PD; Laser + PD; Laser + PD + GB) presented a bigger collagen amount comparing to Control Group and GB Group and bigger reepithelialization. Conjunctive tissue remodeling was better noticed in Laser + PD Group and Laser + PD + GB Group. PDT did not cause any inhibition and any damage in the healing process.

Keywords: Low Level Laser Therapy; Photodynamic Therapy; Photosensitizer; Healing Process.

<b>Sumário</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 SISTEMA TEGUMENTAR	04
1.1.2 Células do Tecido Conjuntivo	06
1.1.2.1 Fibroblastos	06
1.1.3 Fibras Colágenas	07
1.1.4 Substância Fundamental Amorfa	08
1.1.5 Vascularização e Inervação	08
1.1.6 Anexos da Pele	09
1.2. REPARO TECIDUAL	10
1.2.1 Tipos de Cicatrização	12
1.2.2 Fases da Cicatrização	13
1.2.3 Influências Locais e Sistêmicas sobre a Cicatrização	17
1.3. LASER	20
1.3.1 Diodo Semicondutor	24
1.3.2 Laser de Baixa Potência nos Tecidos Biológicos	25
1.4. TERAPIA FOTODINÂMICA	33

1.4.1 Aplicações Clínicas da TFD	39
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>43</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1 Aprovação pelo Comitê de Ética	46
3.2 Divisão dos Grupos	46
3.3 Local da Pesquisa	46
3.4 Equipamentos	47
3.5 Características do Laser	47
3.6 Material Cirúrgico e de Consumo	48
3.7 Procedimento Cirúrgico	49
3.8 Terapia Laser (InGaAlP 685nm)	49
3.9 Agentes Tópicos	51
3.10 Obtenção da Amostras	52
3.11 Procedimento Laboratorial	52
3.12 Análise – Microscopia Óptica de Luz	53
3.13 Aquisição das Imagens Digitais	53
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>54</b>
4.1 Grupo Controle	55
4.2 Grupo Base Gel Tensora (BG)	58
4.3 Grupo Laser	61
4.4 Grupo Fármaco-Fotossensibilizante (FS)	64
4.5 Grupo Laser + FS	67
4.6 Grupo Laser + FS + BG	70
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>

<b>8. ANEXO</b>	<b>99</b>
8.1 Anexo I - Carta do Comitê de Ética	100

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da Pele (GARTNER; HIAT, 1999)	09
<b>Figura 2</b> – Fluxograma dos Efeitos da Inflamação Aguda (STEVENS; LOWE, 1998)	14
<b>Figura 3</b> – Fotobioestimulação e Cicatrização (LICHTENSTEIN et. al., 1999)	19
<b>Figura 4</b> – Espectro Eletromagnético ( <a href="http://fai.unne.edu.ar/biologia/images/espectro.gif">http://fai.unne.edu.ar/biologia/images/espectro.gif</a> )	22
<b>Figura 5</b> – Mecanismo de Fotossensibilização da TFD	35
<b>Figura 6</b> – Aparelho Thera Lase (DMC) e Óculos de Proteção (SILVA, 2003)	47
<b>Figura 7</b> – <i>PUNCH</i> (SILVA, 2003)	48
<b>Figura 8</b> – Aparelho Thera Lase e Suporte de Metal (SILVA, 2003)	50
<b>Figura 9</b> – Agentes Tópicos (FS e BG), e Seringas (SILVA, 2003)	52
<b>Figura 10-</b> Grupo Controle	56

<b>Figura 11 - Grupo Base Gel Tensora (BG)</b>	59
<b>Figura 12 - Grupo Laser</b>	62
<b>Figura 13 - Grupo Fármaco - Fotossensibilizante (FS)</b>	65
<b>Figura 14 - Grupo Laser + Fármaco - Fotossensibilizante (FS)</b>	68
<b>Figura 15 - Laser + FS + BG</b>	71

<b>Lista de Quadros</b>	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1</b> – Distribuição dos Animais em Grupos (SILVA, 2003)	46
<b>Quadro 2</b> – Thera Lase – 685nm (SILVA, 2003)	48
<b>Quadro 3</b> – Distribuição dos Grupos e respectivos Tratamentos (SILVA, 2003)	51

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

**A:** Área

**AsGaAL:** Arseneto de Gálio e Alumínio

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**~:** Aproximadamente

**BG:** Base Gel Tensora

**bFGF:** Fator de Crescimento Fibroblástico

**BPD – MA:** Derivado Lipossomal de Benzoporfirina Monoácida

**CASP:** Sulfoftalocianina Cloroalumínio

**CM:** Células de Merkel

**°C:** Grau Centígrado

**COBEA:** Código Brasileiro de Experimentação Animal

**ẽ:** Comprimento de Onda

**DE:** Densidade de Energia

**DP:** Densidade de Potência

**DHE:** Éter de Dihematoporfirina

**EGF:** Fator de Crescimento Epidérmico

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**FGF:** Fator de Crescimento Fibroblástico

**FS:** Fármaco Fotossensibilizante

**g:** Grama

**HeNe:** Hélio-Neônio

**Hp:** Hematoporfirina

**HpD:** Derivados de Hematoporfirina

**H&E:** Hematoxilina e Eosina

**Hz:** Hertz

**InGaAIP:** Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio

**IV:** Infravermelho

**J:** Joules

**J/cm<sup>2</sup>:** Joule por Centímetro Quadrado

**J/cm<sup>3</sup>:** Joule por Centímetro Cúbico



**LLLT:** Low Level Laser Therapy

**>:** Maior

**MEC:** Matriz Extracelular

**mg/Kg:** Miligrama por Kilo de Peso

**ml:** Mililitro por Grama de Peso

**ml/g:** Mililitro por

**mm:** Milímetro

**mm<sup>2</sup>:** Milímetro ao Quadrado

**mW:** Miliwatt

**mW/cm<sup>2</sup>:** Miliwatts por Centímetro Quadrado

**nm:** Nanômetro

**Pc 4:** Ftalocianina de Silício

**PDGF:** Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

**PG:** Polygen, Droga Utilizada para Acelerar a Cicatrização

**s:** segundos

**S<sub>0</sub>:** Estado Fundamental

**S<sub>1</sub>:** Primeiro Estado Singlete

**SFA:** Substância Fundamental Amorfa

**SS:** Solcoseryl, Droga Utilizada para Acelerar a Cicatrização

**TGF –  $\alpha$ :** Fator de Transformação Alfa

**TGF –  $\beta$ :** Fator de Transformação Beta

**TFD:** Terapia Fotodinâmica

**TNT:** Tecido não Tecido

**UV:** Ultravioleta

**W:** Watts

**W/cm<sup>2</sup>:** Watts por centímetro ao Quadrado

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A habilidade do organismo de reparar e restituir a sua integridade, eventualmente perdida por lesão, é essencial para a manutenção da própria vida. Qualquer ser vivo, durante sua constante interação com o ambiente (exemplo em condições climáticas adversas) e com outros organismos (infecções e infestações), pode necessitar de reparo ou restituição em sua estrutura, de forma a mantê-la funcional.

A cicatrização de feridas é uma resposta organizada e complexa do organismo à lesão dos tecidos com perda de sua integridade. Nas feridas abertas, que cicatrizam por segunda intenção, diversos fatores entram em ação, contribuindo invariavelmente para prolongar a cura das lesões, resultando quase sempre em inflamação, edema e cicatrizes. Várias condutas terapêuticas têm sido empregadas com o objetivo de conseguir um melhor resultado no processo cicatricial. Esforços nas pesquisas, para tratar a perda da pele tem focado três direções principais. Primeiro, através da melhora da cicatrização por fatores que acelerem esse processo e reduzam a cicatriz. Segundo, no desenvolvimento de substitutos da pele ou equivalentes funcionais. Terceiro, na identificação de fatores que induzam a regeneração do que a reparação (cicatriz) da pele (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem-se mostrado uma modalidade clínica promissora para o tratamento de tumores e um número considerável de outras moléstias, como artrites e desordens da pele (PAREKH et.al., 1999). A tendência de pesquisas em TFD tem-se voltado para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores com características melhoradas. O extraordinário desenvolvimento da TFD decorre do seu conceito básico e relativamente simples: combinação de uma droga sensitizadora, luz de comprimento de onda adequado, e oxigênio, junto à elevada interdisciplinaridade que se tem alcançado na pesquisa envolvendo essa modalidade terapêutica (MACHADO, 2000).

Propomos a realização de uma pesquisa que busca *avaliar o efeito do Laser de Baixa Potência isolado e associado com um Fármaco Fotossensibilizante (FS) derivado da Ftalocianina, e uma Base Gel Tensora (BG) no processo de cicatrização de feridas cutâneas padronizadas em ratos, através de análises histológicas.*

As pesquisas indicam que em um futuro próximo, resultados significativos no tratamento das lesões traumáticas serão obtidos para uma melhor restauração estética e funcional da pele. (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001).

## **1.1 SISTEMA TEGUMENTAR**

## 1.1 SISTEMA TEGUMENTAR

O sistema tegumentar é constituído por pele e tela subcutânea, juntamente com os anexos cutâneos (GUIRRO; GUIRRO, 2002). O tegumento é constituído por duas camadas de tecidos importantes e dependentes entre si: a **epiderme**, porção epitelial, e a **derme**, uma porção conjuntiva. Abaixo e em continuidade com a derme está a tela subcutânea, hipoderme, composta por tecido conjuntivo e adiposo que se interpõe entre a pele e os planos profundos adjacentes. São funções do sistema tegumentar: proteção contra agressões do meio externo, meio interno e penetração de microorganismos, regulação da temperatura do organismo, capacidade de absorção da radiação ultravioleta com participação na síntese de vitamina D, excreção pelas glândulas sudoríparas, e sensibilidade (ROSS; ROMRELL, 1993; TCHORNOBAY; FILUS NETO, 1998; GARTNER; HIATT, 1999; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

A **epiderme** compõe a camada superficial da pele, avascular, de origem ectodérmica, e formam um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Classicamente, é dividida em camadas, e possui quatro tipos celulares. Na **camada basal** ou **germinativa**, camada mais profunda, encontra-se os **melanócitos**, células produtoras de melanina (função fotoprotetora); as **células de Langerhans**, um macrófago altamente especializado, tem função importante no sistema imunitário; as **células de Merkel (CM)**, encontram-se entre os queratinócitos da camada basal da epiderme. Na **camada espinhosa**, encontram-se os **queratinócitos**, com duas importantes funções: sintetizar queratina, e formar a barreira epidérmica ou camada córnea. A **camada granulosa**, camada mais superficial da epiderme, apresenta células com citoplasma composto por grânulos de querato-hialina, liberados por exocitose, que tornam esta camada impermeável à água. A **camada lúcida** quando visível apresenta-se clara, brilhante e homogênea, mais comum em áreas de pele espessa. A **camada córnea**, última camada da epiderme, de contato com o meio externo, apresenta espessura variável formada por células anucleares, compactas e resistentes, conteúdo rico em queratina e fibras, e se encontra em

descamação contínua (ROSS; ROMRELL, 1993; RIGAU, 1996; TCHORNOBAY; FILUS NETO, 1998; GARTNER; HIATT, 1999).

A **derme** compõe a camada mais profunda da pele, de origem mesodérmica, constituída por tecido conjuntivo denso, formando uma camada espessa que se interpõe entre a epiderme e a hipoderme. O suprimento vascular da derme é responsável pela nutrição da epiderme, e regula a temperatura, pressão e remove produtos do metabolismo (CORDERO, 1996). Representa um tecido conjuntivo diferenciado, e constitui-se de células, fibras e substância fundamental amorfa (SFA). Estão incluídos os anexos epidérmicos, vasos sanguíneos, terminações nervosas e drenagem linfática. A derme está organizada em **camada papilar**, mais superficial e frouxa que contém as papilas dérmicas, responsáveis pelo contato derme-epiderme, e **camada reticular**, mais profunda e densa que constituem maior parte da derme, com fibrilas de colágeno de maior diâmetro, entrelaçadas e organizadas em feixes largos, responsáveis pela sua resistência (ROSS; ROMRELL, 1993; RIGAU, 1996; ANDRADE, 1999).

A **Pele** se constitui um órgão heterogêneo, e difere-se do ponto de vista anatômico e fisiológico de uma região a outra, e sua variação está ligada a fatores como, faixa etária, sexo, e região do corpo (CORDERO, 1996). É possível, através de certas substâncias mudar a cor da pele, como administrar agentes lipossolúveis associados a fármacos-corantes, que são absorvidos. Essa propriedade de absorção é aproveitada na administração de terapêuticos para a pele. (RIGAU, 1996, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

## 1.1.2 Células do Tecido Conjuntivo

### 1.1.2.1 Fibroblastos

São células pluripotenciais que produzem as fibras extracelulares (**fibras**

**colágenas, elásticas e reticulares), e a substância fundamental amorfa** do tecido conjuntivo. Responsáveis pela síntese e degradação do tecido conjuntivo fibroso e não-fibroso, representam a principal célula desse tecido. São células fusiformes, com um grande núcleo ovóide, prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, cromatina fina, nucléolo grande, algumas mitocôndrias e complexo de Golgi (ROSS; ROMRELL, 1993; ANDRADE, 1999). O **miofibroblasto** é considerado um fibroblasto modificado, com características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa, apresenta propriedades contráteis, realizam a contração–retração do ferimento, função primordial no processo de cicatrização (ROSS; ROMRELL, 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Os fibroblastos ativos, além de produzir todos os componentes da matriz do tecido conjuntivo, associado às células endoteliais dos vasos fabricam a *fibronectina*, uma glicoproteína com importante função na adesão celular, morfologia, migração e diferenciação, sendo assim, fundamental na cicatrização. (CORDERO, 1996; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Diferentes células dérmicas podem transitar pelo tecido conjuntivo, mesmo em condições de normalidade. Algumas células são definidas como “residentes”, como os **mastócitos, macrófagos**, e os **fibroblastos**. Outras circulam pelo tecido conjuntivo principalmente em processos patológicos, agindo como defensores do organismo, como na reparação de feridas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

### 1.1.3 Fibras Colágenas

São sintetizadas pelos fibroblastos e células afins. O colágeno é a principal proteína fibrosa do tecido conjuntivo, apresenta estrutura em tríplice-hélice, enroladas e organizadas em espiral por três subunidades em cadeias polipeptídicas denominadas alfa-hélices. As diferenças nas subunidades das cadeias peptídicas permitem classificá-los em isotipos de colágenos, designados



por algarimos romanos. Os tipos I, II e III formam estruturas fibrilares e similares e são os mais abundantes. (ROSS; ROMRELL, 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

#### 1.1.4 Substância Fundamental Amorfa (SFA)

A substância fundamental amorfa constitui o elemento não fibroso da matriz, preenche os espaços entre as células e as fibras do tecido conjuntivo. Apresenta consistência que varia de um gel fluido até um gel semi-sólido (GUIRRO; GUIRRO, 2002). É responsável pela regulação do componente hídrico da derme, que estão ligados às proteínas formando os proteoglicanos (TCHORNOBAY; FILUS NETO, 1998).

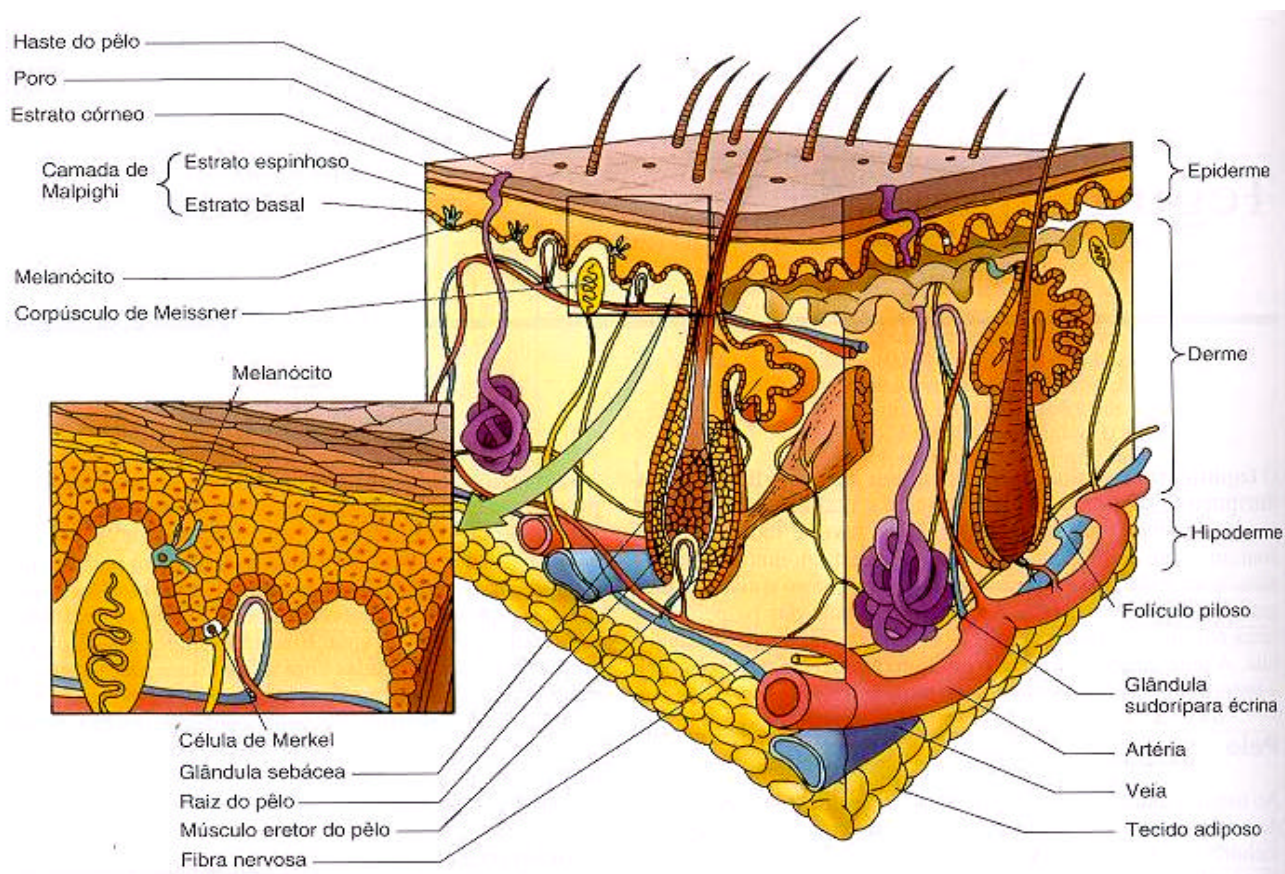
#### 1.1.5 Vascularização e Inervação

O suprimento vascular da pele se dá através do plexo profundo, que se situa entre a derme e a hipoderme, e o plexo superficial, entre a camadas papilar e reticular de onde partem finos ramos para as papilas dérmicas (GUIRRO; GUIRRO, 2002). Os vasos linfáticos controlam a pressão do fluido intersticial, e são responsáveis por várias funções importantes, como o retorno do líquido intersticial para a corrente sanguínea, respostas imunes específicas (produção de anticorpos), destruição de microorganismos e partículas estranhas da linfa.

A **pele** é um órgão sensorial com vasta rede de terminações nervosas livres e especializadas, que conduzem os impulsos ao sistema nervoso central para serem integrados. As terminações nervosas livres são os receptores para a dor, que se distribuem por baixo das células da camada profunda da epiderme. Os corpúsculos de *Paccini*, de *Meissner* e a rede de fibras nervosas dos folículos pilosos, são responsáveis pelas sensações táteis. Os corpúsculos de *Krause* intervêm nas sensações de frio, e os corpúsculos de *Ruffini* nas sensações de calor (CORDERO, 1996; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

### 1.1.6 Anexos da Pele

Representam um conjunto de estruturas derivadas da pele, como os pêlos, unhas, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas (RIGAU, 1996) (Figura 1):



**Figura 1-** Representação esquemática da pele (GARTNER; HIATT, 1999).

## **1.2 REPARO TECIDUAL**

## 1.2 REPARO TECIDUAL

A capacidade de reparação tecidual envolve diversas reações que fazem parte de um complexo processo biológico, de fundamental importância para a sobrevivência dos seres vivos. Normalmente se inicia com uma lesão ou alteração das condições corporais com algum tipo de agente agressor. É uma capacidade que está presente desde o nível celular, e associam eventos de natureza imunitária, fatores químicos, e produção de matriz extracelular (BRASILEIRO FILHO et al. 1993; RIGAU, 1996; STEVENS; LOWE, 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

O reparo tecidual envolve dois processos distintos, e que são separados: a **regeneração** e a **cicatrização**. A regeneração significa reposição da perda tegumentar por substituição de células do mesmo tipo, ou seja, por tecido organizado, idêntico em estrutura e função ao tecido original. Na cicatrização, a reposição do tegumento se dá pela reconstituição da área lesada por tecido não especializado, formando uma cicatriz fibrosa e permanente pela proliferação de tecido conjuntivo (STEVENS; LOWE, 1998; ANDRADE, 1999; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Quando se inicia um processo de reparo tecidual, três fases são características: a **fase inflamatória**, a **fase de proliferação** e a **fase de remodelação**. Essas fases particularmente se sobrepõem, e cada fase tem um perfil de atividade celular característico (BJORDAL; JOHNSON; COUPPÈ, 2001). A seqüência desses eventos cicatriciais tem como objetivo imediato o fechamento da ferida ou reparo dos tecidos envolvidos.

Majno; Joris (1996) <sup>1</sup> descreveram que o plano básico do processo de cicatrização, de uma maneira geral, é sempre o mesmo: preencher aquele espaço e selá-lo com uma cicatriz. Os detalhes de que forma isso irá evoluir variam segundo a presença ou ausência de bactérias, a natureza da ferida (se

---

<sup>1</sup> MAJNO G.; JORIS, I. **Cells, tissues and diseases. Principles of general pathology**. EUA: Blackwell Science, 1996; p. 465-482.

é fechada ou aberta), o grau de suprimento sanguíneo, quantidade de tecido morto para ser eliminado, o tipo de tecido lesado e, muitos outros fatores.(MAJNO; JORIS, 1996 *apud* ALMEIDA-LOPES, 1999).

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão, induzida por agressão local (ARAÚJO et al., 1998). Consiste num complexo processo que envolve: processo inflamatório agudo induzido pela lesão inicial; regeneração de células parenquimatosas; migração e proliferação de células parenquimatosas e tecido conjuntivo; síntese de proteínas da matriz extracelular (MEC); remodelagem do tecido conjuntivo e de componentes parenquimatosos; colagenização e aquisição de resistência da ferida (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

### 1.2.1 Tipos de Cicatrização

O fenômeno cicatricial na pele é descrito de duas maneiras distintas: cicatrização primária ou por primeira intenção e cicatrização secundária ou por segunda intenção. Uma ferida se cicatriza por **primeira intenção**, quando suas bordas estiverem próximas, e não houver cavidade ou tecido inviável em seu interior. É um processo de menor destruição tecidual, sendo mais rápido e com formação de cicatrizes menores. Fazem parte da cicatrização dessas feridas as incisões cirúrgicas, suturadas, e que são clássicas nesse tipo de cicatrização, e as lacerações limpas e não infectadas. É uma ferida estreita, com formação reduzida de miofibroblastos, devido a pouca contração (BRASILEIRO FILHO et al., 1993).

Na cicatrização por **segunda intenção**, o processo se torna mais complexo, com grande perda tecidual, onde a regeneração das células parenquimatosas é insuficiente para repor a estrutura original do tecido lesado. Essas feridas são mais extensas, e podem retardar o processo de cicatrização se forem abertas, com as bordas das lesões separadas, chamadas excisionais, ou então, feridas que tenham sido infectadas. A regeneração do tegumento é

mais lenta, com crescimento maior e mais evidente de tecido de granulação, que acontece das margens da ferida para o centro. A exsudação de fagócitos, reação inflamatória, perda de anexos e a cicatriz, são mais evidentes e intensos nesse tipo de cicatrização. O fenômeno de contração da cicatriz é mais exuberante e atribuído aos miofibroblastos, que são fibroblastos que assumem um fenótipo contrátil (BRASILEIRO FILHO et al. 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

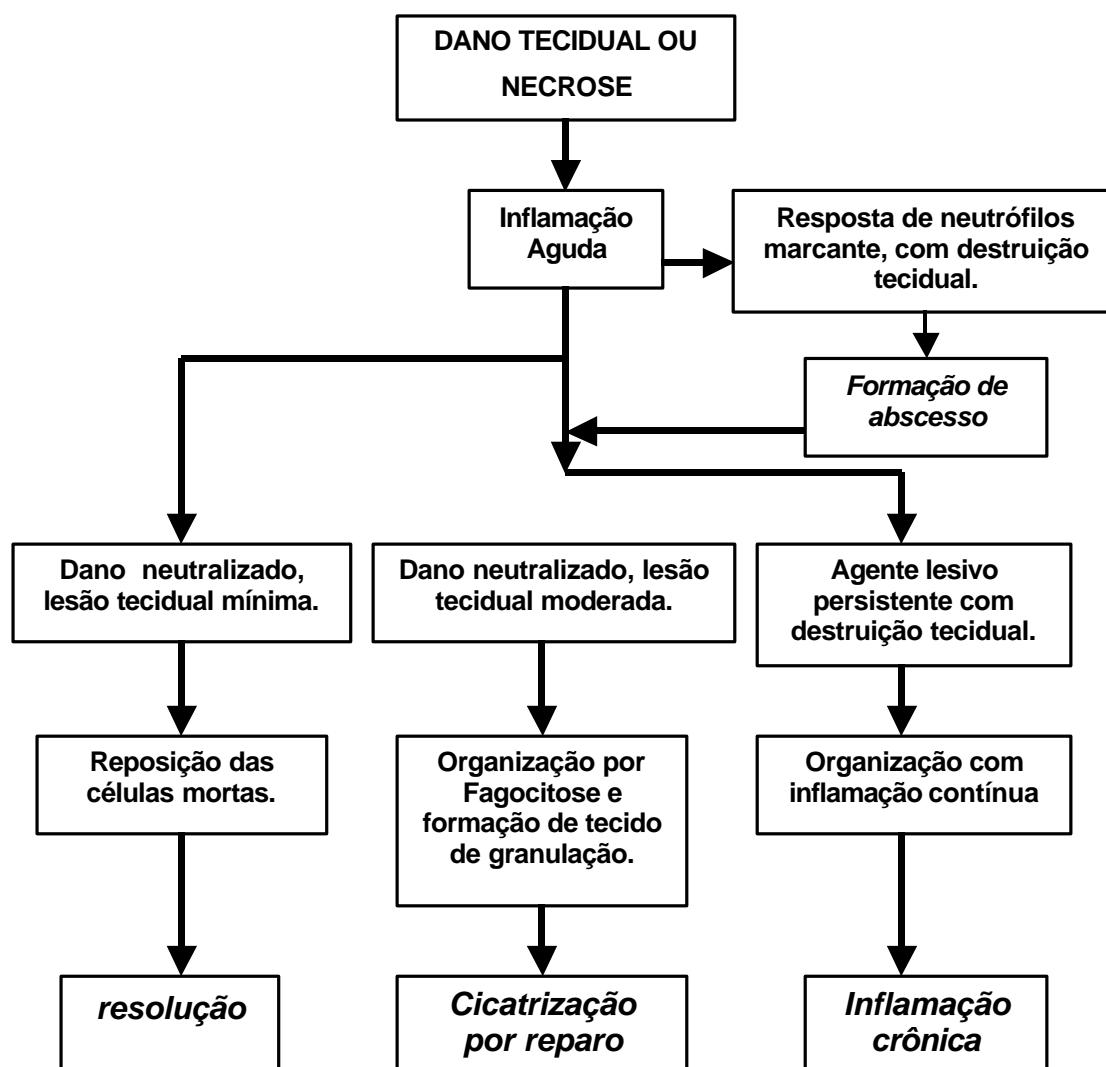
O que difere esses dois tipos de cicatrização é a quantidade de material que será necessário para preencher o defeito tecidual, mais do que diferenças de natureza mecânica especial (STEVENS; LOWE, 1998). Nesse trabalho enfocaremos o processo de cicatrização por segunda intenção, de feridas abertas padronizadas, causadas por lesão intencional.

### 1.2.2 Fases da Cicatrização

No processo de cicatrização, a **fase inflamatória** se inicia em resposta imediata a uma lesão, que ocorre pelo dano às células, provocando morte celular e ruptura dos vasos sanguíneos. A inflamação é basicamente o resultado da microcirculação dos tecidos reagindo à lesão. A palavra inflamação é derivada de um termo do latim que significa *queimar*, (LOW; REED, 2001), já que a pele quando envolvida torna-se quente, vermelha, edemaciada e dolorosa (BJORDAL; JOHNSON; COUPPÈ, 2001; LOW; REED, 2001). As células inflamatórias limpam a ferida da contaminação de microorganismos e debris teciduais (CLARK, 1996). Em circunstâncias favoráveis, a reação inflamatória aguda é adequada para controlar o evento lesivo e preparar o local para a recuperação (Figura 2).

A finalidade fundamental da fase inflamatória do reparo consiste em livrar a área de tecido morto, destruir qualquer infecção invasora anterior ao reparo e permitir o acesso do sistema imune à área danificada. A reação vascular inicial envolve hemorragia e perda de líquido, ocasionada pela

destruição dos vasos, com uma conseqüente vasoconstrição e coagulação sanguínea. A hemostasia ocorre em função do depósito de plaquetas e fibrinas, que causam a coagulação local, e que resulta na produção de fatores químicos que iniciam e controlam o processo de cicatrização. A coagulação do sangue extravascular se deve a ação de plaquetas e de mecanismos intrínsecos e extrínsecos da coagulação. A protrombina é convertida em trombina, e em decorrência disto, o fibrinogênio é convertido em fibrina, proporcionando uma matriz inicial da ferida (KITCHEN; BAZIN, 1998). Surgem fatores quimiotáticos e vasoativos a partir do coágulo e do tecido lesado. A crosta na superfície da ferida é formada pela desidratação do coágulo.



**Figura 2** – Fluxograma dos efeitos da inflamação aguda (STEVENSON; LOWE, 1998).

A resposta inflamatória provoca alterações na microcirculação como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de plasma no local da ferida, ocasionando exsudato inflamatório, composto por proteínas do plasma, anticorpos, glóbulos vermelhos e brancos (eritrócitos e leucócitos) e plaquetas. A migração e a ação celular são iniciadas e representadas pelos monócitos, neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, surgem dentro de 24 horas com ação de fagocitose e a tarefa de limpar o local de partículas e bactérias. Dentro de 24 a 48 horas ocorre a projeção de células epiteliais das bordas que migram e crescem nas margens cortadas da derme, depositando componentes da membrana basal (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Ao terceiro dia os neutrófilos são substituídos por macrófagos, essenciais para o processo de reparo na transição do processo inflamatório para reconstrução do tecido lesado, e podem exercer a mesma tarefa dos neutrófilos, estimulam a angiogênese e a produção de fatores de crescimento, que atraem fibroblastos para a ferida e incrementam a deposição de colágeno, denominando a **fase proliferativa**. (KITCHEN; BAZIN, 1998; MONETA; 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A produção de fatores de crescimento está diretamente ligada à reparação tissular, como o fator de crescimento epidérmico - EGF; fatores de crescimento derivado das plaquetas - PDGF; fatores de crescimento fibroblásticos - FGF; fatores de transformação beta e alfa – TGF-  $\beta$  e TGF –  $\alpha$ ; interleucina-1 e outros; substâncias quimiotáticas e enzimas proteolíticas (DUARTE; DIOGO, 2000). Os mediadores químicos comandam o processo de inflamação, importante, uma vez que esse processo pode ser modificado por drogas medicamentosas, que minimizam os efeitos indesejáveis e potencialmente prejudiciais. Entre eles estão: a histamina, que é o principal mediador pré-formado da inflamação; prostaglandinas; leucotrienos; fator ativador das plaquetas; óxido nítrico e sistema complemento (STEVENS; LOWE, 1998).



Uma vez iniciada a formação do tecido de granulação, integrinas são necessárias para neovascularização e provavelmente para o crescimento de fibroblastos (CLARK, 1996). A migração de fibroblastos dentro da área da ferida e a rápida neovascularização, constituem um sinal para o início da fase de síntese e depósito de proteínas colágenas e não colágenas da matriz extracelular (MEC) no leito da lesão, processo denominado de fibroplasia (RIGAU, 1996). A matriz extracelular de vários tecidos conectivos tais como a pele, consiste de macromoléculas complexas, colágeno, elastina, e glicosaminoglicanos, e a biosíntese dessas macromoléculas envolve várias reações específicas que estão freqüentemente sob rigoroso controle enzimático (ABERGEL et al., 1984).

A angiogênese é a formação de novos vasos em resposta à lesão. Um processo dinâmico que é controlado de diversas maneiras, algumas vezes fatores complexos agindo juntos no ambiente local. O principal tipo de célula envolvido no processo de angiogênese é a célula endotelial microvascular. Esse tipo de célula é certamente distinto do revestimento endotelial dos grandes vasos das funções fisiológicas do sistema circulatório inicial normal, e isto, em resposta à lesão (CLARK, 1996).

Os capilares não danificados do tecido formam novos capilares, através de brotamento na área lesada, formando um tecido de granulação vascular, com capilares interconectados, macrófagos e células de sustentação, que substituem a área de tecido danificado. Os espaços intervasculares se preenchem com fibroblastos produtores de colágeno, que se alinham uniformemente para depositar o colágeno, de forma que proporcione resistência ao estresse físico, e são responsáveis por essa nova matriz, formando um tecido de granulação fibroso. Começam a sintetizar ácido hialurônico, fibronectina, e colágeno do tipo I e III. Os miofibroblastos agem na contração desse novo tecido, reduzindo o tamanho da ferida. A produção densa de colágeno leva a formação de uma cicatriz colagenosa (STEVENS; LOWE, 1998).

A acumulação excessiva de tecido conjuntivo é a característica fundamental de várias desordens adquiridas e hereditárias, especificamente, a deposição de colágeno, maior característica em vários processos fibróticos. A síntese ativa de colágeno e outros componentes do tecido conjuntivo, são necessárias para uma ótima cicatrização durante o período que antecede a reparação tecidual (ABERGEL et al., 1984).

A reepitelização é o termo comumente usado para indicar a cobertura da ferida da pele, com um novo epitélio. Na prática clínica, esse termo é pouco preciso e usualmente não leva em consideração a complexidade das células especializadas envolvidas no processo de cicatrização e maturação da camada epidérmica humana (CLARK, 1996). A fase de **maturação** ou **remodelamento tissular** é a última fase do processo de cicatrização. A maturação da ferida resulta em aumento e reorganização do tecido cicatricial, que tem como função aumentar a força tênsil da lesão, que no início apresenta-se como uma cicatriz rosada e alargada, e que se torna gradativamente mais pálida, endurecida e com aspecto fibrótico (DUARTE; DIOGO; 2000). Assim, uma cicatriz de tecido conjuntivo denso substitui o local da ferida (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

### 1.2.3 Influências Locais e Sistêmicas sobre a Cicatrização

Muitos fatores encontrados durante o processo de inflamação ou durante a cicatrização da ferida, prejudicam o processo de organização e reparo (STEVENS; LOWE, 1998). Dentre os **fatores locais** destacam-se a infecção e a presença de corpos estranhos (que retardam a cicatrização, pois prolongam o processo inflamatório levando à destruição tissular adicional); fatores mecânicos, como fricção e cisalhamento (que podem contribuir para romper a integridade tissular); o tipo, a dimensão e localização da lesão (uma vez que, áreas com rica vascularização e lesões pequenas cicatrizam mais rápido); e exposição a radiações (que reduz a capacidade de reparo ao bloquear a mitose celular, e podem levar a úlceras crônicas) (BRASILEIRO

FILHO et al. 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; DUARTE; DIOGO, 2000).

Dentre os **fatores sistêmicos**, destaca-se o estado nutricional do indivíduo que auxilia na defesa do organismo contra infecções e na necessidade de produzir novo tecido. A falta de vitamina C, proteínas e zinco interferem na síntese de colágeno e retardam a cicatrização tecidual. Além desses fatores, as condições sistêmicas como diabetes mellitus, distúrbios hematológicos e aterosclerose também influenciam no processo de cicatrização. A vascularização, sendo a oxigenação e perfusão tissular indispensáveis para manutenção e reparo da lesão; e hormônios como os corticóides e cortisona (sintéticos), são antiinflamatórios que interferem nos componentes do processo inflamatório, na fibroplasia, e inibem a síntese de colágeno (BRASILEIRO FILHO et al. 1993; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; DUARTE; DIOGO, 2000).

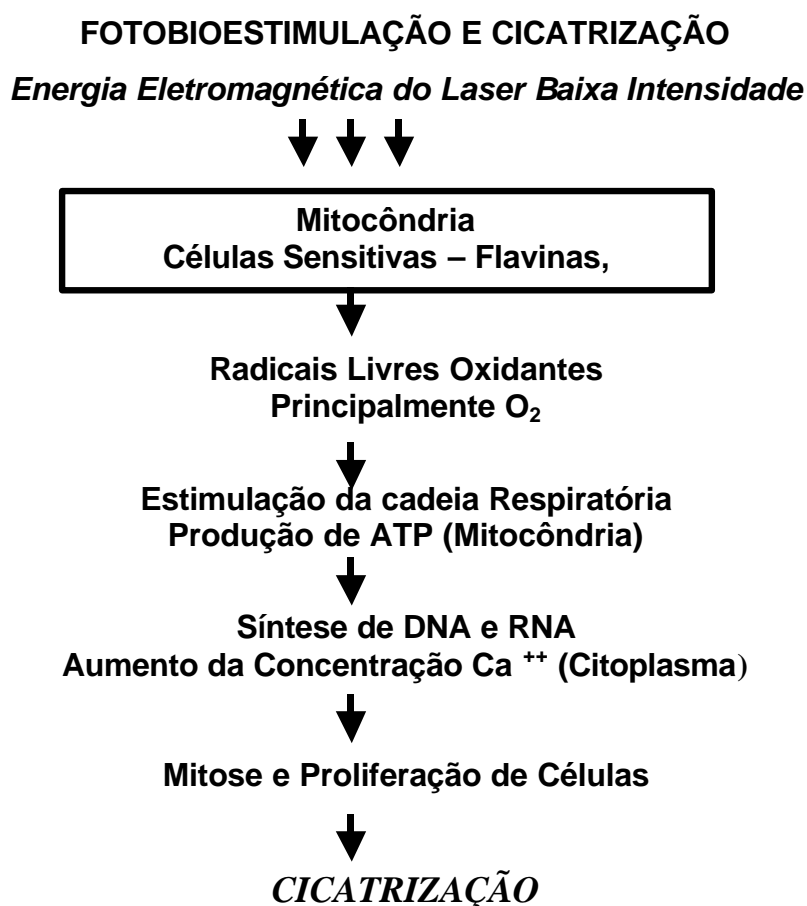
A cicatrização de feridas pode ser dividida em três fases: Do dia zero ao quinto dia, é a fase inicial, sem ganho de força e a ferida é dependente de suturas (se necessário) e adesão celular epidermal para manter o fechamento da ferida. Do quinto ao décimo quinto dia, é a fase fibroblástica, ocorre rápido aumento de força de tensão na ferida. A partir do décimo quarto dia, observa-se tecido de granulação maturado, que resultará em cicatriz fibrosa. (POWERS, 1997 <sup>2</sup> *apud* VERA MENDEZ, 2002).

A aplicação de instrumentos avançados e tratamentos variados, direcionados para promover um ambiente de cicatrização total em feridas, têm sido listados durante muitos anos e por diversos autores. Os mecanismos complexos que envolvem a reparação tecidual, desde os mecanismos que envolvem a inflamação até a completa reepitelização são investigados constantemente. A aplicação do Laser na saúde constitui área ativa de

---

<sup>2</sup> POWERS, M.P.; BECK, B.W.; FONSECA, R.J. **Oral and maxillofacial trauma**. Philadelphia: W.B.Sauders, 1997. p. 792-804. c.24.

pesquisas, e seus efeitos médicos e biológicos, principalmente na cicatrização (Figura 3) são relatados desde a década de sessenta (MAIMAN, 1960; KANA et al., 1981; ABERGEL et al., 1984; MESTER; MESTER; MESTER, 1985; ROCHKIND; et al., 1987; KARU, 1989; HONMURA et al., 1993; KIM et al., 1996; YU; NAIM; LANZAFAME; 1997; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; TATURANAS; MATERA; DAGLI, 1998; AL-WATBAN; ANDRES, 2000; LAGAN et al., 2002), bem como a aplicação de substâncias que reduzam os efeitos de contaminação e que favoreçam o processo cicatricial (ARAÚJO et al., 1998; MONETTA, 1998; BIONDO–SIMÕES et al., 2000; VON KOSSEL et al., 2000; MINOSSI et al., 2001; HAMBLIN et.al., 2002).



**Figura 3** – Fotobioestimulação e Cicatrização (LICHTENSTEIN et al., 1999).



### 1.3 LASER

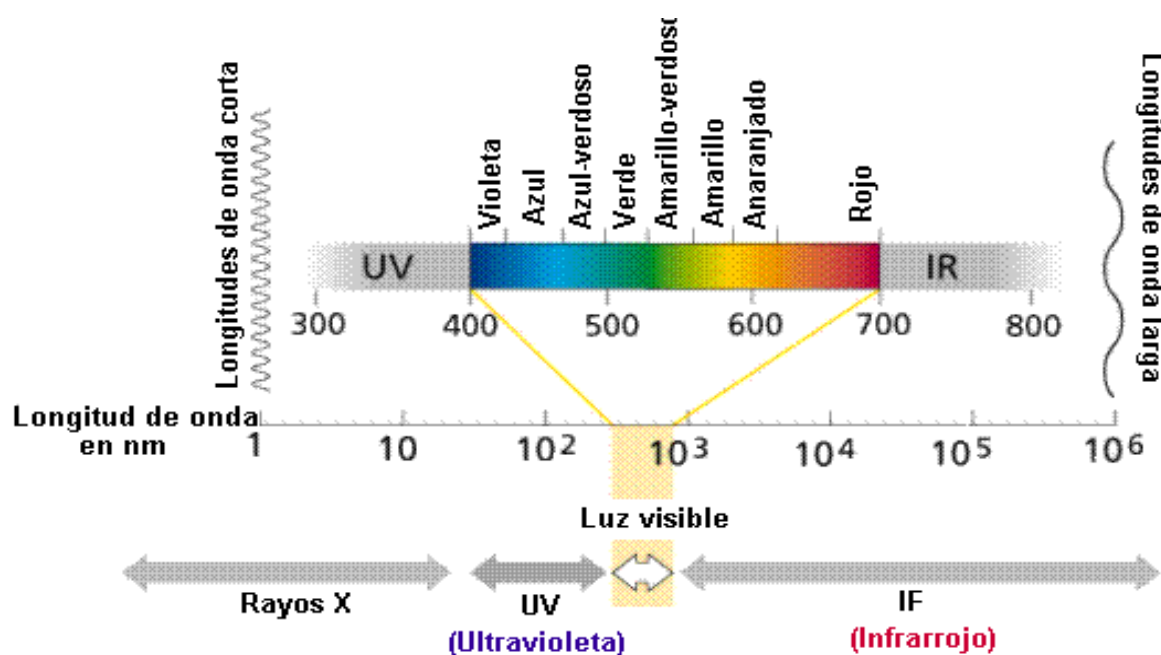
A palavra LASER significa “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation “ ou “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação (HARRIS; PICK, 1995; LOW; REED, 2001).

A tecnologia a laser começou em 1917 quando Einstein formulou a Teoria da “Emissão Estimulada”, que foi baseada na Teoria Quântica, proposta por Planck em 1890, que discute a quantidade de energia liberada pelo processo atômico. O primeiro laser da história foi construído por Theodore Maiman, enquanto trabalhava nos Laboratórios Hughes em Malibu, na Califórnia - USA, (MAIMAN, 1960), produziu um raio de luz vermelha com um cristal de rubi com comprimento de onda de 694,3nm, com características diferentes da luz do sol ou de lâmpadas incandescentes (HENDERSON; 1997; GENOVESE; 2000; MELLO; MELLO, 2001). O primeiro laser a gás, um He-Ne, foi desenvolvido por Javan e colaboradores em 1961 (GENOVESE, 2000).

O laser tem sido largamente utilizado em todo o mundo nas últimas décadas, inclusive nas áreas médicas e paramédicas. É uma fonte de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que em contato com diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo de laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares. Seu meio ativo resulta em luz laser de comprimento de onda específico e cada comprimento de onda reage de uma maneira diferente com cada tecido. As características peculiares de cada tecido, principalmente as que controlam reações moleculares e bioquímicas devem ser observadas. Geralmente, a extensão da interação entre lasers e os tecidos é determinada pelo comprimento de onda da luz laser e pelas características ópticas de cada tecido (PINHEIRO, 1998).

A luz é tida como fenômeno ondulatório, constituída de pequenos pacotes de energia eletromagnética, os fótons. As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por sua frequência, comprimento de onda e energia (Figura 4).

Os comprimentos de onda da energia laser variam seus respectivos espectros, que vão desde a área ultravioleta, ondas mais curtas, até a região do infravermelho longo, ondas mais longas. O laser visível apresenta comprimentos de ondas que ocupam pequena parte desse espectro eletromagnético. O **comprimento de onda** é a distância entre duas sucessivas cristas ou picos do espectro eletromagnético, sua unidade de medida é o nanômetro, e determina a cor; a **amplitude** de uma onda é a altura do topo da crista, na vertical, e indica a força da onda; e a **freqüência**, é a medida do número de cristas ou picos que passam por um determinado ponto durante o período de um segundo, e é expressa em Hertz (Hz), (GENOVESE, 2000; MELLO; MELLO, 2001).



**Figura 4:** Espectro eletromagnético. Disponível em: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/images/espectro.gif> Acesso: 25 abr.2003.

Os efeitos da radiação laser no tecido, são governados por cinco parâmetros relativos à energia e à potência. São eles: **energia**, **fluência**, **densidade de energia**, **potência** e **irradiância**. A **energia**, usualmente é

mensurada em joules (J), e é proporcional ao número de fótons incidentes no alvo; a **fluência** é a energia por unidade de área (A), usualmente especificada em Joules/cm<sup>2</sup>; a **densidade de energia** (DE) é a energia depositada por unidade de volume, dada em Joules/cm<sup>3</sup>, e dependente da fluência incidente, dos parâmetros de espalhamento no tecido, e coeficiente de absorção, em adição a fluência liberada por um pulso simples, e o valor integrado da fluência somada de muitos pulsos, variações na distribuição espacial são importantes; a **potência** é a energia distribuída por unidade de tempo e é usualmente mensurada em Joules/segundo ou watts (W), neste contexto, ambos, o valor médio de tempo e o valor de pico podem ser importantes; e a **irradiância** é a potência por unidade de área, normalmente relatada em watts/cm<sup>2</sup>, e novamente ambos os valores de pico e valores médios de tempo, bem como à distribuição espacial e temporal são importantes (ITZKAN; BOURGELAIS, 1997).

A radiação laser pode ser classificada de acordo com a potência de emissão em: **Laser de Alta Potência ou Laser Cirúrgico**, sistema que emite radiações de alta potência com poder destrutivo associado aos efeitos fototérmicos, e dependendo do coeficiente de absorção do tecido, podem levar ao corte, vaporização, coagulação e esterilização; e **Laser de Baixa Potência ou Laser não Cirúrgico**, que emite radiações de baixa potência, sem poder destrutivo, e possuem ação fotoquímica e fotobiológica, como analgésica, antiinflamatória e de bioestimulação (PINHEIRO, 1998; ALMEIDA - LOPES, 1999; GENOVESE, 2000; LOW; REED, 2001).

O uso do laser operando em baixa potência para terapia foi tema de diversos trabalhos científicos publicados por Endre Mester de Budapeste, pioneiro na terapia de “Bioestimulação com Laser”, que apresentou relatos de aplicações experimentais tanto *in vitro* como clinicamente (MESTER; MESTER; MESTER, 1985; RIGAU, 1996; ROSENSHEIN, 1997). Seu uso é distinto do uso do laser em cirurgia no qual os efeitos terapêuticos aparentemente surgem direta ou indiretamente da interação eletromagnética da luz com o tecido e não



dos efeitos térmicos ou fotoquímicos (ROSENSHEIN, 1997). Na medicina o princípio do mecanismo de conversão da energia do fóton é o aquecimento com destruição do tecido (KARU, 1998).

Os lasers utilizados na terapia de baixa potência estão situados na porção visível do espectro eletromagnético, bem como no infravermelho (IV) próximo. Hoje em dia, os lasers usados nessa terapia são o laser He-Ne ( $\lambda = 632.8\text{nm}$ ), como os lasers semicondutores e diodos de emissão de luz ( $\lambda = 600\text{-}1000\text{nm}$ ) (KARU, 1998). A fluência ou densidade de energia (DE) mais utilizada se situa entre  $0.1 - 10 \text{ J/cm}^2$  e a irradiância ou densidade de potência (DP) entre  $0.01 - 100 \text{ mW/cm}^2$ . A dose de irradiação ou densidade de energia é o parâmetro mais importante na terapia com laser (RIGAU e MAS, 1998).

### **1.3.1 Diodo Semicondutor**

O diodo laser é um chip semicondutor que funciona como um diodo elétrico. A região ativa do diodo é um sanduíche de diferentes materiais semicondutores consistindo de uma camada de material tipo P (carregam a carga positiva), uma camada não condutora (junção), e uma camada de material tipo N (carregam carga negativa). A voltagem negativa aplicada ao material – N e a voltagem positiva aplicada ao material – P, fazem os condutores fluírem na junção, e a energia é liberada. Na maioria dos materiais semicondutores, a energia é liberada como calor, mas em materiais como gálio, alumínio, e arsênio, a energia é liberada como fótons. Para fazer um laser de diodo, é necessário adicionar uma superfície reflectiva no fim da junção para estabelecer uma cavidade óptica. Estas cavidades ópticas são muito pequenas, e mesmo nessa escala alguns lasers de diodo podem produzir muitos watts de potência. Os diodos têm comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho que são determinadas pelo material semicondutor e temperatura (HARRIS; PICK, 1995).

Os diodos de laser semicondutores podem fornecer uma saída contínua ou pulsada. Os diodos de onda contínua são em geral de potência relativamente baixa (LOW; REED, 2001). O laser semicondutor é capaz de emitir potências que podem variar de 10 a 100W, normalmente é usado o mW (miliwatt) para modalidade terapêutica de laser de baixa potência, com ação de estimulação celular (GENOVESE, 2000). Os lasers de diodo são de tamanho compacto, de alta eficiência e confiabilidade, e custo reduzido (HENDERSON, 1997).

### 1.3.2 Laser de Baixa Potência nos Tecidos Biológicos

Um interesse considerável pelos efeitos do laser de baixa potência na biomodulação do tecido e metabolismo celular tem surgido nas últimas décadas, onde numerosos estudos foram publicados avaliando aspectos variados dos efeitos do laser de baixa potência em sistemas biológicos, como na produção de matriz extracelular, reparação de tecido e funções imunes das células (HALCIN; UITTO, 1997).

Os fatores biológicos que influenciam na interação laser-tecido são mais extensos e muitas vezes complexos, e alvos de estudos recentes. Dentre tais fatores estão as propriedades ópticas de vários elementos teciduais, que funcionam como moléculas específicas e componentes químicos, na reação do tecido com energia da luz (MISERENDINO; LEVY; MISERENDINO, 1995).

Dederich (1991)<sup>3</sup> relata que propriedades ópticas do tecido determinam a natureza e extensão da resposta tecidual através de processos de **absorção, transmissão, reflexão e espalhamento** do raio laser. E que a extensão da interação da luz laser como forma de energia radiante com o tecido deverá ser geralmente determinada por duas variáveis dependentes: o **comprimento de onda** da emissão laser; e as **características ópticas** em particular do tecido alvo.(DEDERICH, 1991 *apud* MISERENDINO, 1995).

---

<sup>3</sup> DEDERICH, D.N. **Laser tissue interaction**. Alpha Omegan, 1991; 84: 33-36.

Toda radiação eletromagnética ao incidir sobre uma superfície qualquer, se desdobra, uma parte reflete e outra é absorvida (RIGAU, 1996). Os efeitos clínicos teciduais desejados com o laser são baseados no fenômeno de absorção, mas todas as respostas teciduais diferentes ao laser (reflexão, transmissão, dispersão e absorção) contribuem no efeito tecidual final (GRAY, 1998).

A energia radiante irá interagir com o tecido através de quatro formas (MISERENDINO; LEVY; MISERENDINO, 1995; GRAY, 1998; RIGAU i MAS, 1998):

- a) ser **refletida**, onde não ocorrerá penetração ou interação da energia da luz laser;
- b) ser **transmitida** através do tecido, sem nenhum efeito clínico na área alvo;
- c) ser **absorvida**, pelos componentes fotoreceptivos (cromóforos) do tecido alvo, o que resulta na transferência de energia para esse tecido;
- d) ser **espalhada** (dispersão), sem produzir efeitos notáveis no tecido;

A grande maioria dos cromóforos, como fibras colágenas, células e organelas, vasos sanguíneos e linfáticos são bastante reduzidos em tamanho, e ocorrem em concentrações variadas no tecido e exercem influência na difusão do laser (exemplo a hemoglobina e melanina) (PINHEIRO, 1998). Nos tecidos a absorção da luz pela água produz-se próximo ao infravermelho (IV) com  $\lambda$  maiores que 1.200nm e no ultra violeta (UV) com  $\lambda$  menores que 200nm. É a presença de substâncias pigmentadas em menor ou maior proporção que determinará a menor ou maior transmissão de onda luminosa respectiva. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos que responde a um ou vários  $\lambda$ , fenômeno descrito como ressonância a uma determinada frequência (RIGAU i MAS, 1998).

Diamantopoulos (1994)<sup>4</sup> relata que as radiações visíveis são fortemente absorvidas pela hemoglobina e melanina (cromóforos), enquanto o infravermelho é fortemente absorvido pela água. (DIAMANTOPOULOS, 1994 *apud* LOW; REED, 2001).

Os lasers de baixa potência emitem densidades de energia muito baixas para causar aumento da temperatura além de 0.5 °C no tecido alvo, sendo os seus efeitos observados e não atribuídos a eventos térmicos (HALCIN; UITTO, 1997). O efeito biológico que resulta da absorção de energia depositada no tecido pelo laser é classificada em efeitos primários e secundários. Vão agir primeiramente na célula, produzindo um **efeito imediato** ou **primário**, aumentando o metabolismo celular (KARU, 1989; 1999), por exemplo, no controle da produção de substâncias liberadas nos fenômenos de dor e inflamação (Prostaglandinas, Prostaciclina, Histamina, Serotonina, Bradicina, Leucotrienos e outras), como na estimulação da produção de ATP no interior da célula (KARU; PYATIBRAT; KALEND, 1995; WILDEN; KARTHEIN, 1998). A radiação laser ajuda também a normalizar o potencial da membrana, atuando como reequilibrante e normalizador da atividade funcional da célula. (RIGAU i MAS, 1998; GENOVESE, 2000; LOW; REED, 2001).

Os **efeitos indiretos** ou **secundários** da radiação laser ocorrem em nível de microcirculação, onde o laser atua sobre o esfíncter pré-capilar, por meio de mediadores químicos, provocando uma dilatação persistente, portanto, um estímulo a microcirculação, e em nível de trofismo celular e aumento da velocidade de mitose, fato que leva a concluir que o laser de baixa potência aumenta os processos de reparação tecidual, devido ao estímulo na capacidade de cicatrização do tecido conjuntivo e neoformação de vasos a partir dos vasos já existentes (RIGAU i MAS, 1998; GENOVESE, 2000).

---

<sup>4</sup> DIAMANTOPOULOS, C. **Bioenergetics and tissue optics**. In Therapeutic Lasers: Theory and Practice (Baxter G. D., ed.) Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994, p. 67-88.

Fatores como o nível de potência aplicada (DP); a energia total distribuída por área de superfície (DE); o tipo de tecido e sua capacidade de absorção; frequência de pulsos por segundo e duração do pulso; o modo de entrega da energia para o tecido alvo (contínuo ou pulsado); distância focal (focado ou desfocado); presença ou não de sistema de refrigeração são essenciais para interação com o tecido. A manipulação desses fatores deverá permitir ao operador ter controle preciso com o laser para alcançar o efeito desejado no tecido, juntamente com habilidade para selecionar o comprimento de onda apropriado para o tecido alvo em particular (MISERENDINO; LEVY; MISERENDINO, 1995; LOW; REED, 2001; MELLO; MELLO, 2001).

A importância dos estudos envolvendo os efeitos da irradiação de luz de baixa potência comparativamente na pele, são fundamentais para outras investigações e servem como modelo para estudos envolvendo os efeitos do laser na epiderme (epitélio) e na derme (CATONE; HALUSIC JR.; 1997). Especialidades médicas, odontológicas e reabilitativas utilizam a terapia laser de baixa potência em várias aplicações terapêuticas, incluindo analgesia, efeitos antiinflamatórios e reparação tecidual, citada por alguns autores (MESTER, et. al., 1985; KARU, 1989; BAXTER et al., 1991; OKAMOTO; IWASE; MORIOKA, 1992; BASFORD, 1995; HERNANDEZ; DELGADO, 1996; RIES; SPEYER, 1996; GIUSEPPE, 1999).

O laser de baixa potência tem sido usado por Fisioterapeutas (para tratar a ampla variedade de dores músculo-esqueléticas agudas e crônicas); Dentistas (no tratamento de tecido oral inflamado e cicatrização de úlceras diversas); Dermatologistas (no tratamento de edema, úlceras indolentes, queimados e dermatites); Reumatologistas (no alívio da dor, tratamento de inflamações crônicas e doenças auto-imunes); Medicina Veterinária (em centros de treinamentos de cavalos de raça); e em Medicina do Esporte e Clínica de Reabilitação (para reduzir o inchaço e hematoma, aliviar a dor e melhorar a mobilidade e tratamento agudo de feridas de tecido mole) (KARU, 1998).

Vários estudos foram realizados descrevendo os efeitos terapêuticos dos lasers, tanto *In Vitro* (ABERGEL et al., 1984; PASSARELLA et al., 1984; RIGAU, 1996; GROSSMAN et al., 1998; HOUGHTON; BROWN, 1999; KARU; 1999; LUBART; FRIEDMANN; LAVIE, 2000; STADLER et al., 2000; KREISLER et al., 2001; ALMEIDA-LOPES et al., 2001) como *In Vivo* (KANA et al., 1981; BASFORD, 1995, YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; MORRONE et al., 1998; TATURANAS, 1998; LICHTENSTEIN, 1999; SIMUNOVIC; IVANKOVICH; DEPOLO, 2000; AL-WATBAN; ANDRES; 2000; AL-WATBAN, 2001; LAGAN et al., 2002).

A reparação tecidual e cicatrização de feridas *in vivo* englobam a maioria dos estudos realizados, que são beneficiados com os efeitos do laser de baixa potência. Alguns autores não obtiveram nenhum efeito dessa terapia sobre o processo de cicatrização (MALM; LUNDEBERG, 1991; SCHALAGER et al.; 2000; WALKER et al., 2000; YILMAZ et al. , 2002), muitas vezes, pelo uso de fluências extremamente baixas (HALL, 1994) ou pela administração de altas doses de energia (HOUGHTON; BROWN, 1999), podendo inibir certas atividades celulares, levando a um estado de fadiga (BASFORD, 1995; RIGAU, 1996).

O efeito mais importante do laser de baixa potência na cicatrização de feridas foi o aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos, observado nos experimentos de Rigau (1996), que usando um microscópio eletrônico, monitorou essa síntese para a captação de prolina e glicina tritiada.

Um estudo realizado por Wei Yu et al. (1997) descreveu os efeitos do laser de Argônio operando em 630nm, potência de pico de 20mW/cm<sup>2</sup> e 5 J/cm<sup>2</sup>, em feridas padronizadas de ratos diabéticos. O autor dividiu o estudo em quatro grupos: 1. controle; 2. grupo bFGF (aplicação tópica de fator de crescimento); 3. grupo laser; 4. grupo laser associado bFGF. Os autores avaliaram os resultados a partir da evolução histológica, que mostrou que a irradiação laser melhorou a epitelização das feridas, a quantidade de células, a

formação de tecido de granulação e deposição de colágeno, comparado às feridas do grupo controle negativo. O grupo 2 e o grupo 4 apresentaram resultados similares em relação ao tratamento do grupo 3. Através desse estudo, de bioestimulação laser na cicatrização de ratos diabéticos os autores sugerem que semelhante terapia possa ser benéfica no tratamento de feridas crônicas, parecidas com as que ocorrem na complicação da diabetes mellitus.

Estudos da influência do laser de baixa potência em cicatrização, tem mostrado resultados controversos, e em situações de queimaduras são mais escassos. Um estudo envolvendo 30 ratos e queimaduras de ambos os flancos foi realizado, com dois diferentes  $\lambda$  e  $1.5 \text{ J/cm}^2$  (DE). Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo A (controle); grupo B (635nm e  $1.5 \text{ J/cm}^2$ ); grupo C (690nm e  $1.5 \text{ J/cm}^2$ ). O diâmetro, a vermelhidão e o edema das feridas foram examinados diariamente, e os resultados mostraram que esses parâmetros, entre e dentro dos grupos foram similares durante todo período de observação. A irradiação das queimaduras não acelerou a cicatrização quando comparada com as feridas controle. Os autores concluíram que ambos os comprimentos de onda dos lasers pesquisados não produziram efeitos benéficos no processo de cicatrização de queimaduras de ratos (SCHLAGER, 2000).

Um estudo realizado por Al-Watban et al. (2000), avaliou a bioestimulação laser, a combinação de tratamento farmacológico Solcoseryl<sup>TM</sup> (SS) e Polygen<sup>TM</sup> (PG) com terapia de luz, usando modelos *in vitro* e *in vivo*. O estudo *In vitro*, indicou a capacidade de fótons laser e agentes farmacológicos SS ou PG em aumentar a eficácia da clonagem de várias linhas celulares. Os estudos *In vivo*, foram realizados em ratos normais, enfocaram a dosimetria de vários comprimentos de onda laser e o uso de drogas. Os resultados mostraram que os efeitos da exposição laser foram dependentes da dose, dando efeitos de estimulação ( $2\text{-}16 \text{ J/cm}^2$ ), bioativação zero ( $20 \text{ J/cm}^2$ ) e inibição ( $24\text{-}28 \text{ J/cm}^2$ ). O laser de HeNe 632,8nm proporcionou melhor aceleração em dias na cicatrização, com melhor absorção fibroblástica, e com uma densidade de potência incidente de  $10.53 \text{ mW/cm}^2$  mostrou-se ótima na

aceleração da cicatrização. Todos os tratamentos foram significativamente melhores que o controle, e o tratamento com o laser foi de 5 a 7 vezes melhor que SS e PG respectivamente; o uso do laser mais SS e laser mais PG deu adicional aceleração na cicatrização, mas insignificante quando comparado ao laser sozinho. Este estudo mostrou dependência do comprimento de onda, dependência do programa de tratamento e dependência da dose de fótons na cicatrização. A aplicação de tratamentos farmacológicos combinados com terapia laser revelou a utilidade da combinação de tratamento droga - luz.

Simunovic et al. (2000), realizaram um estudo para avaliar a eficácia da terapia laser de baixa potência (LLLT) na cicatrização em coelhos e humanos. A parte inicial da pesquisa foi conduzida em feridas cirúrgicas produzidas em coelhos. Os 68 animais foram tratados durante 20 dias consecutivos e divididos em quatro grupos: Controle; Laser HeNe (632nm e 4J/cm<sup>2</sup>); Laser Infravermelho (904nm e 20J/cm<sup>2</sup>); Laser HeNe associado ao Infravermelho (632nm + 904nm e 24J/cm<sup>2</sup>). Os autores observaram a força tênsil do tecido, crescimento epidermal, razão de contratura da ferida, concentração de linfócitos e formação de colágeno. Concluíram que a camada epidermal foi aumentada com a exposição HeNe e 4J/cm<sup>2</sup> e a razão de cicatrização foi significativamente diferente, como o aumento na concentração de linfócitos e formação de colágeno. As altas densidades de energia (20, 24J/cm<sup>2</sup>) aplicadas em coelhos apresentaram menor efeitos ou mesmo, efeitos opostos. As maneiras de aplicações do LLLT no corpo humano são análogas à aquelas de estruturas fisiológicas similares em tecido animal, portanto, os autores continuaram o estudo em humanos.

A segunda parte do estudo de Simunovic et al. (2000) envolveu 74 pacientes com injúrias em diferentes localizações anatômicas (tornozelo e joelho, bilateralmente; tendão de Aquiles; epicôndilo; ombro; pulso; articulação interfalangiana das mãos, unilateralmente). Todos os pacientes tinham tido procedimentos cirúrgicos antes do laser de baixa potência. Dois tipos de aparelho laser foram usados: laser diodo infravermelho (AsGaAL) 830nm



contínuo para tratamento de pontos gatilho e HeNe 632,8nm combinado com laser de diodo 904nm pulsado para procedimento de *scanner*. Os resultados foram observados e mensurados de acordo com os seguintes parâmetros clínicos: vermelhidão, calor, dor, inchaço, diminuição da função e por análise estatística. Depois de comparar o processo de cicatrização entre os dois grupos obteve-se uma cicatrização significativamente acelerada (25% - 35%) no grupo de pacientes tratados com laser. A principal vantagem do LLLT no pós-operatório inclui preservação da margem de efeitos de drogas, recuperação funcional significativa, um rápido retorno ao trabalho, treinamento ou competição esportiva, comparando ao grupo controle de pacientes, e custo benefício.

Um estudo clínico avaliou a eficácia da terapia laser no tratamento de úlcera de estase devido à síndrome da insuficiência venosa crônica. O tratamento foi realizado em pacientes de 6 meses a 6 anos. O grupo incluiu 62 pacientes de ambos os sexos, dois diferentes aparelhos de lasers e densidade de energia de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ . No primeiro ano, 42 pacientes foram tratados com um laser HeNe (632,8nm e 8mW), e nos últimos 3 anos, 20 pacientes foram tratados com um laser diodo infravermelho AsGaAl (830nm e 120mW). O fechamento da ferida foi alcançado depois de 7 à 40 sessões de tratamentos, na maioria desses 62 pacientes com úlceras crônicas antigas na perna. Os autores alcançaram a completa cicatrização, classificada como: Boa - em 53 pacientes (85.48%) durante o período de tratamento de 2 à 14 semanas; e Moderada – em 4 pacientes (6.46%), no fechamento de úlceras venosas antigas na perna. A eficiência do tratamento foi de 91.94%, e nenhum paciente teve que parar o tratamento por efeitos colaterais. Dois pacientes (3.2%) tiveram recorrência da úlcera. Os autores indicaram através dos resultados que doses apropriadas de laser podem ser benéficas em promover reparação tecidual (LICHTENSTEIN, 1999).

## **1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA**

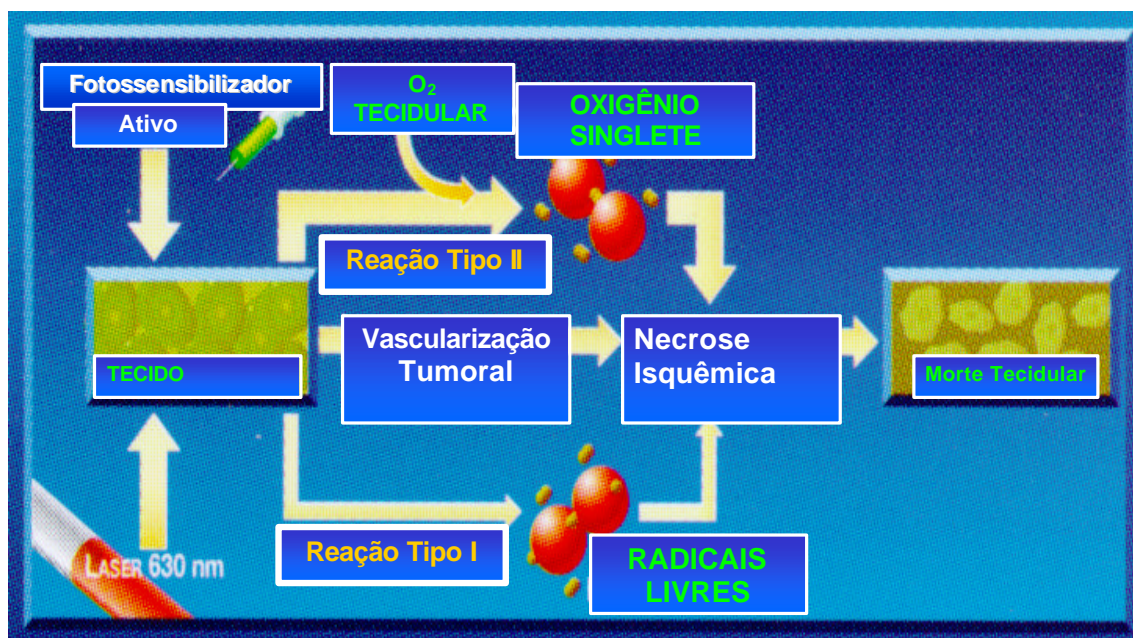
## 1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A terapia fotodinâmica envolve ativação de **luz** (visível e infravermelho próximo), na presença de **oxigênio molecular** (em nível ambiente), e certos corantes, denominados **fotossensibilizadores**, que são capturados pelo tecido alvo (BONNETT, 2000; SIBATA et al., 2000).

Relativamente, é uma nova modalidade terapêutica para tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas (STUART, L., 1992; SIBATA et al., 2000). Essa terapia tem sido usada no tratamento de uma variedade de condições que incluem tumor, artrites, e desordens da pele. A técnica é baseada na injeção, ingestão, ou aplicação tópica de fotossensibilizadores seguida por ativação luminosa (PAREKH et al., 1999). Esses fotossensibilizadores são compostos que absorvem energia da luz de comprimento de onda específico, capazes de usar esta energia para induzir reações em moléculas que não seguem a mesma seqüência de reações fotoquímicas (SIBATA et al., 2000).

Os estudos de fotossensibilização iniciaram por volta de 1900, quando Oscar Raab investigou o efeito dos corantes eosina e acridina sobre paramécio e percebeu que, em presença de luz este microorganismo era rapidamente inativado (NELSON; McCULLOUGH; BERNIS, 1997). A primeira aplicação terapêutica de corantes em combinação com luz foi proposta por Von Tappeiner and Jesionek em 1903, que empregou uma solução de eosina e luz para tratar câncer de pele e observou uma redução no tamanho do tumor (NIEMZ, 1996). Em 1913, Meyer-Betz, cientista alemão, estudou o efeito fotodinâmico de porfirinas em humanos. Injetou em si mesmo, intravenosamente hematoporfirina (HP), expondo pequenas regiões da pele de seu braço a luz visível, o que resultou em uma forte reação de eritema solar e alta sensibilidade para luz por dois meses, indicando o efeito fototóxico do HP, e provando que estes compostos podem induzir a fotossensibilização sistêmica no homem (CASTRO; SAXTON; SOUDANT, 1997).

O mecanismo de oxidação fotossensível na terapia fotodinâmica é iniciado pela absorção da luz pelo sensibilizador, o qual pode ser um corante ou pigmento, uma quinona, ou uma molécula aromática. O sensibilizador, por capturar o fóton, é elevado para um alto estado de energia, onde este pode agora atuar como um agente oxidante. As principais classes de reações são: a foto-oxidação por radicais (**reação tipo I**); foto-oxidação por oxigênio singlete (**reação tipo II**). Os fatores que governam estas reações incluem a concentração de oxigênio, o substrato reativo e estado excitado do sensibilizador, concentração de substrato, e tempo de vida do oxigênio singlete. Alta reatividade do sensibilizador, alta concentração e reatividade do substrato, baixa concentração de oxigênio, e curto tempo de vida singlete favorecem a reação do tipo I, enquanto os fatores opostos favorecem o tipo II (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; CASTRO; SAXTON; SOUDANT, 1997; SIBATA et al., 2000;). No Mecanismo de Fotossensibilização (figura 5), são apresentadas as etapas fotoquímicas envolvidas no processo:



**Figura 5** – Mecanismo de Fotossensibilização da TFD .

A explosão no interesse em TFD data da descoberta de derivados da hematoporfirina (HPD) por Lipson e Baldes em 1960, e sua aplicação na irradiação de tumores malignos, onde encontraram uma excelente correlação entre a fluorescência de tumor e histologia maligna. Esse foi o combustível para estudos pioneiros, ambos em ciências básicas e aplicações clínicas realizadas por Dougherty (LIPSON; BALDES, 1960; BUCHANAN et al., 1989; DOUGHERTY, 1975; 1978; 1979; HAMBLIN; HASAN, 1996). Nas duas últimas décadas, o campo da terapia fotodinâmica (TFD) recuperou popularidade, colaborando pelo desenvolvimento da indústria óptica eletrônica, iniciada com a introdução dos lasers em 1960 por Maiman (MAIMAN, 1960; CASTRO; SAXTON; SOUDANT, 1997).

Os estudos que deram início a TFD moderna foram realizados no Instituto do Câncer de Roswell Park em Buffalo, Nova York, EUA, avaliando-se a eficácia à longo prazo, no tratamento de tumores em animais e humanos com o emprego de HPD e seu derivado purificado e componente ativo, éter de dihematoporfirina (DHE) (DOUGHERTY et al., 1975; 1978). A TFD foi realizada inicialmente com lâmpadas convencionais de amplo espectro, como as lâmpadas de filamento incandescentes (tungstênio), lâmpadas de arco (xenônio, mercúrio) (DOUGHERTY et al.; 1978).

Ao mesmo tempo, que muitos artigos na terapia fotodinâmica começaram por afirmar que TFD é um novo tratamento experimental para o câncer e outras doenças, houve um rápido amadurecimento nos últimos 5 anos, levando a aplicações clínicas e sendo hoje a TFD considerada um padrão de tratamento aceitável para várias condições. Foi aprovado para uso pelo U.S Food and Drugs Administration (FDA) e numerosas outras agências de saúde por todo o mundo (DOUGHERTY, 2002).

Os fotossensibilizadores comumente usados em TFD representam um grupo de componentes quimicamente não homogêneos. Eles podem ser representados em grande parte pelos corantes tiazine, tais como, azul de

metileno e azul de toluidine, usados topicamente em TFD, e as porfirinas, tais como, derivado de hematoporfirina, e o metaloftalocianina (JAMIL et al., 2002). A maioria das experiências clínicas de TFD vem do uso das variantes de porfirinas, HPD e DHE. A nova geração de fotossensibilizadores clínicos fornecerá sem dúvida um aumento na seletividade do tumor em relação ao tecido normal, com um aumento da eficiência de foto-ativação comparável, e uma maior absorção da luz visível vermelha e infravermelho próximo.

Com a colaboração de clínicos, biólogos, químicos, engenheiros e fotoquímicos muitos fotossensibilizadores diferentes e novos sistemas laser cobrindo ampla faixa de comprimento de onda, vêm sendo desenvolvidos em laboratórios e testados clinicamente (CASTRO; SAXTON; SOUDANT, 1997). Um número crescente de fotossensibilizadores de segunda geração está sendo sintetizado. Esses novos fotossensibilizadores estão sendo desenvolvidos para absorver em comprimentos de onda mais longos (650 para 850nm), os quais permitem maior profundidade de penetração da luz em cavidades do corpo e maior eficiência de fotoativação, e são mais seletivos para tecido maligno. Entre as novas drogas que estão sendo estudadas estão as naftalocianinas, purpurinas, benzoporfirinas, e as ftalocianinas (ABT, 1995; FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995). As ftalocianinas apresentam uma banda de absorção máxima com  $\lambda > 600\text{nm}$  (BEN-HUR; ROSENTHAL, 1985).

Os lasers são tradicionalmente a fonte de luz preferida para ativação de agentes fotossensibilizantes usados em TFD, e sua monocromaticidade, capacidade de altas potências, e a habilidade de acoplar essas potências em fibras ópticas tem direcionado o seu uso (SIBATA et al., 2000). Concorrendo com o desenvolvimento destes novos fotossensibilizadores, a indústria óptica-eletrônica desenvolveu diodos de emissão de luz de alta potência para várias disposições de aplicações. A disponibilidade de LEDs e a sua compatibilidade com o fotossensibilizador tem permitido o desenvolvimento de fontes de luz com potências suficientes para ativação da droga (LYTLE, 1993).

O rápido avanço tecnológico nos modelos de lasers de diodo, que cobrem praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, pode atender boa parte dos agentes fototerapêuticos já existentes no mercado, e permitir uma nova abordagem produtiva para investigações e aplicações clínicas de TFD (MACHADO, 2000). Hoje em dia, buscam-se sistemas lasers mais eficientes e estáveis, com tecnologia mais barata e ao mesmo tempo, diodos de menor tamanho e potências de pico maiores (CASTRO; SAXTON; SOUDANT, 1997).

Quando a droga é iluminada com comprimento de onda apropriado de luz visível não térmica, pode sofrer excitação eletrônica com subsequente transferência de energia para produzir espécies moleculares altamente reativas e citotóxicas. Uma vez que, mais fotossensibilizadores estão presentes nos tumores em relação ao tecido normal, os tumores podem ser destruídos com dano relativamente limitado em relação às estruturas que o circundam (WIEMAN et al., 1988).

Wilson (1989)<sup>5</sup> cita que um fator importante quanto às características fotofísicas favoráveis é o comprimento de onda da luz, necessária a fotoexcitação do composto. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior o seu grau de penetração no tecido. A radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento, e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos que absorvem em comprimentos de onda menores, principalmente a hemoglobina, fazem com que a penetração de luz seja menor (WILSON, 1989 *apud* SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A efetividade da fonte de luz para TFD depende da irradiância espectral incidente da luz, transmissão no tecido para a profundidade desejada, e a absorção do sensibilizador que depende diretamente da absorção dos cromóforos. Esses elementos são matematicamente combinados para produzir

---

<sup>5</sup>WILSON, P.C. **Photosensitizing Compounds: their Chemistry**, Biology and Clinical Use, Wiley Interscience: Chichester, 1989, p.73

a “razão de fluência efetiva total” na profundidade especificada. Na aplicação do modelo em prática para várias fontes de luz, parece que a luz verde é muito mais efetiva que a luz vermelha para tratamentos a uma profundidade de até 2 mm na derme, mas a luz vermelha parece dar melhor penetração na pele superficial (MOSELEY, 1996).

#### 1.4.1 Aplicações Clínicas da TFD

Sibata et al. (2000) descreveram que a extensão do comprimento de onda entre 600 e 800nm tem sido determinado como “janela terapêutica” prática para TDF clínica. Em um trabalho extenso, relataram tratamentos utilizando a terapia fotodinâmica com emissores de luz lasers de diferentes comprimentos de onda, em diversas áreas médicas, com uma variedade de fotossensibilizadores e suas diversas densidades de energia. Destacou a ftalocianina de silício (Pc 4;  $\lambda_{abs} = 670\text{nm}$ ), que é uma nova promessa de fotossensibilizadores de segunda geração desenvolvido pelas Universidades Case Western Reserve e Hospitais Universitários de Cleveland. Com a ajuda da Rede de Decisões de Medicamentos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Drug Decision Network of the US National Cancer Institute). A ftalocianina de silício teve completa evolução na farmacocinética pré-clínica, eficiência e toxologia, e tem sido recomendada para testes clínicos.

A pouca atenuação da irradiação laser têm sido atribuída para o efeito bactericida do laser, particularmente usando lasers de baixa densidade de energia. O efeito bactericida da irradiação laser de HeNe (632nm), foi estudado em microorganismo cariogênicos, pela formação de uma inibição do crescimento de colônias bacterianas viáveis, através de várias espécies de corantes (corante azul, roxo e verde, e principalmente corantes de fenilmetano). O vazamento de potássio da *S. sobrinus* AHT seguindo irradiações a laser foi determinado através do uso de um espectrômetro de absorção atômica. O vazamento começou a aumentar seguindo irradiações de 2 minutos, e alcançou um platô seguindo irradiações de 30-60 minutos. Os



autores sugerem que esse laser pode ser adequado para aplicações em odontologia preventiva. Concluíram através desse estudo que o raio laser de HeNe pode ser seguramente aplicado dentro da boca de humanos, e que as bactérias cariogênicas foram rapidamente mortas pela irradiação, sendo eficiente somente na presença de corantes específicos (OKAMOTO; IWASE; MORIOKA, 1992).

O aumento crescente no mundo da resistência aos antibióticos necessita do desenvolvimento de novas estratégias antimicrobiais. Hamblin et al. (2002) relataram o primeiro uso de uma abordagem fotoquímica para destruir bactérias infecciosas de uma ferida em modelo animal. Utilizaram aplicação tópica, de um fotossensibilizador policatiônico no alvo, conjugado entre **poli-L-lisina** e **chlorin<sub>e6</sub>**, penetraram o Gram (-) fora da membrana bacteriana, e subsequente ativação com luz laser 660nm, rapidamente matou *Escherichia coli* que infectava a ferida excisional em ratos. Utilizaram uma bactéria que expressava luz a partir da *Photorhabdus luminescens* para facilitar monitoramento do tempo real da infecção; as células emitiam um sinal bioluminescente que permitia a rápida quantificação da infecção, usando uma sistematização de luz baixa. Houve uma perda da luminescência dependente da dose de luz na ferida tratada com o conjugado e a luz, que não foi vista nas feridas não tratadas, e as feridas tratadas cicatrizaram tão bem quanto às feridas de controle, mostrando que o tratamento fotodinâmico não danificou o tecido em questão. Os autores observaram que:

- TFD de feridas infectadas não levou a nenhuma inibição da cicatrização;
- O tratamento fotodinâmico não danificou o tecido tratado;
- Houve uma indicação que a TFD – de feridas tratadas na verdade cicatrizaram um pouco mais rápido em relação às feridas controles, mas isto não foi estatisticamente significativo;

O ponto principal do estudo é a possibilidade de usar esta metodologia no rápido controle de feridas e outras infecções localizadas.

A influência da TFD na modulação da cicatrização e formação de cicatriz não tem sido bem explorada, como também, os efeitos de fotossensibilizadores fotodinâmicos. Em um estudo, 24 ratos foram divididos em dois grupos, de acordo com o fotossensibilizador, distribuição da fluência de luz, e o tempo incisão (ferida) relativo para exposição da luz. Sete feridas foram colocadas em cada animal, 3 feridas no flanco esquerdo serviram de controle, e 4 feridas no flanco direito serviram para tratamento. Houve a administração de 2 diferentes fotossensibilizadores: BPD-MA (derivado lipossomal de benzoporfirina monoácida) e CASP (sulfoftalocianina cloroalumínio), e a luz foi produzida com um laser de argônio bombeando um módulo de corante.

- Doze animais receberam injeção de BPD-MA 3 horas antes da irradiação, comprimento de onda de 690nm e irradiância de  $400\text{mW/cm}^2$ , e foram subdivididos em 2 grupos:
  - Seis animais receberam 0.25 mg/kg, e a fluência de luz administrada foi de 1 e  $5\text{J/cm}^2$  (3 animais) e 10 e  $20\text{J/cm}^2$  (3 animais);
  - Seis animais receberam 0.5 mg/kg, e a fluência administrada foi de 10 e  $20\text{J/cm}^2$  (3 animais) e 50 e  $100\text{J/cm}^2$  (3 animais).
- Doze animais receberam injeção de CASP, 24 horas antes da exposição da luz, comprimento de onda de 675nm e irradiância de  $400\text{mW/cm}^2$ :
  - Seis animais receberam 5 mg/kg, e a fluência administrada foi de 1 e  $5\text{J/cm}^2$  e 10 e  $20\text{J/cm}^2$  (3 animais);
  - Seis animais receberam 10 mg/kg, e a fluência administrada foi de 10 e  $20\text{J/cm}^2$  e 50 e  $100\text{J/cm}^2$  (3 animais);

Os resultados foram obtidos através de análise histológica e do aspecto macroscópico diário das feridas num período de 14 dias. Os animais tratados com BPD-MA (0.25 mg/kg) não apresentaram nenhum efeito com a TFD. Os tratados com BPD-MA (0.5 mg/kg), e 5 e 10 mg/kg CASP mostraram respostas

que variaram com ambas, as luzes e as doses de drogas. Eritema, edema, inflamação e necrose atribuídos à TFD foram observados, mas não houve aparente influência da TFD em ambos os tratamentos, em razão a aparência macroscópica e histológica final da cicatrização. Os autores concluíram que um único tratamento de TFD dado antes ou após não mostrou influência importante na cicatrização. A TFD pode ter efeitos que não foram detectados (PAREKH et al., 1999).

O uso tópico ou injetável de outros fotossensibilizadores pode alterar a cicatrização. Além disso, resultados mais eficazes poderiam aparecer com a aplicação de múltiplas doses de TFD com intervalos de tempos variáveis.

## **2. OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito do Laser de Baixa Potência (InGaAlP; 685 nm), isolado e associado com um Fármaco – Fotossensibilizante (FS) derivado da Ftalocianina, e uma Base Gel Tensora (BG) no processo de cicatrização de feridas cutâneas padronizadas em ratos, através de análises histológicas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

Neste trabalho foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Salesianas de Lins (ANEXO I).

#### 3.2 Divisão dos Grupos

A pesquisa utilizou 60 ratos Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), machos, adultos jovens, pesando entre 200-250 g, obtidos do Biotério da Faculdade Salesianas de Lins, SP. Os animais foram divididos em 6 grupos, conforme descreve o quadro 1:

**Quadro 1** – Distribuição dos animais em grupos (SILVA, 2003).

<b>GRUPOS</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>
<b>Controle</b>	<b>10</b>
<b>Base Gel Tensora (BG)</b>	<b>10</b>
<b>Laser</b>	<b>10</b>
<b>Fármaco - Fotossensibilizante (FS)</b>	<b>10</b>
<b>Laser + FS</b>	<b>10</b>
<b>Laser + BG + FS</b>	<b>10</b>

#### 3.3 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Eletrotermofototerapia da Faculdade Salesianas de Lins, SP. Os animais foram mantidos antes e após o procedimento cirúrgico no Biotério da Faculdade Salesianas, em gaiolas

individuais e apropriadas, em condições ambientais de temperatura, luminosidade, controle de ruídos, limpeza e cuidados especiais favoráveis. A dieta foi livre e padronizada Labina® e água “*ad libidum*”.

### 3.4 Equipamentos

Foi utilizado um aparelho Thera Lase da empresa DMC, São Carlos, SP, Brasil (figura 6), Microscópio Óptico para análise das lâminas histológicas; Micrótomo (Mícron GmbH, HM 315, Waldorf, Germany) para cortes das amostras; Estufa Retilínia (Quimis); Medidor de Potência; Máquina Fotográfica Digital.



**Figura 6** – Aparelho Thera Lase (DMC) e Óculos de Proteção (SILVA, 2003).

### 3.5 Características do Laser

O laser utilizado e suas características para o comprimento de onda de 685nm, foram descritas conforme o manual do fabricante, quadro 2:



**Quadro 2 – Thera Lase - 685nm (SILVA, 2003).**

<b>EMISSOR VISÍVEL</b>
<b>Comprimento de Onda: 685nm (típico)</b>
<b>Potência do Emissor: 50mW</b>
<b>Meio Ativo: InGaAlP</b>
<b>Área do Feixe: 2 mm<sup>2</sup></b>
<b>Divergência: 1,5°</b>

### 3.6 Material Cirúrgico e de Consumo

Para a realização do procedimento cirúrgico foram necessários os seguintes materiais: *punch* de 8mm de diâmetro (ABC Instrumentos Cirúrgicos Ltda., São Paulo, SP) (Figura 7); bandeja cirúrgica; tesoura cirúrgica; pinça clínica; cabo de bisturi; lâminas de bisturi nº 15; seringa plástica de insulina descartável 1ml (Becton Dickinson and Company, EUA); campo estéril de TNT; gaze estéril; soro fisiológico; luvas descartáveis; anestésico Zoletil® 50 (Virbac S. A; São Paulo – SP); clorexidina a 1% (DM - Indústria Farmacêutica Ltda).

**Figura 7 – PUNCH (SILVA, 2003).**

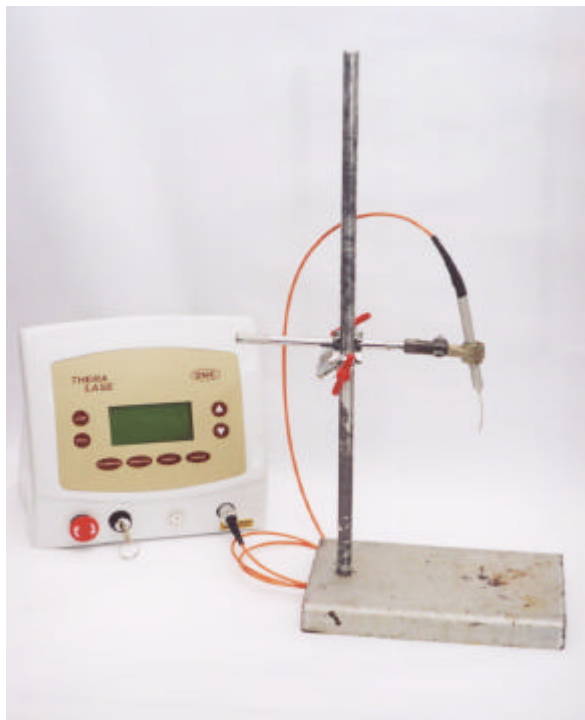
### 3.7 Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico nos 60 animais foi realizado sob anestesia geral, com injeção intramuscular de anestésico Zoletil® 50, com uma dose de 0,1 ml/ 100g de peso, na perna direita do animal. Em seguida, foi realizada a tricotomia no dorso de cada animal com posterior aplicação de solução tópica de clorexidina (1%) para assepsia, lavagem com soro fisiológico, e secagem da área com gaze estéril. O *punch* (8mm diâmetro) foi posicionado perpendicularmente sobre a área do dorso tricotomizada, e friccionado contra a pele, realizando uma ferida excisional padronizada à nível de derme e epiderme, e penetração de cerca de 1mm que é a delimitação da área de corte do *punch*. Após a recuperação anestésica, os ratos foram transferidos para gaiolas individuais, observados e tratados diariamente.

### 3.8 Terapia Laser (Diodo InGaAlP 685 nm )

O aparelho laser utilizado (Thera Lase – DMC), apresenta todas as especificações de exigência internacional, e um ponto de calibração que garante que a dosimetria programada seja a mesma emitida pelo spot de saída do laser. A irradiação laser foi administrada em três grupos distintos: Grupo **Laser**; Grupo **Laser + Fármaco Fotossensibilizante (FS)**; e Grupo **Laser + FS + Base Gel Tensora (BG)** (Quadro 3). Após o procedimento cirúrgico, os grupos a serem irradiados receberam a primeira aplicação de laser. A irradiação foi realizada em quatro pontos de  $2,5\text{J}/\text{cm}^2$  (dose total de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  por sessão), sempre no mesmo horário, uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos, com a fibra óptica fixada em um suporte de metal perpendicularmente sobre as margens da ferida, com aproximadamente 2 milímetros de distância, e densidade de potência de 35 mW (figura 8). A aplicação transcutânea do laser sobre a borda da ferida foi realizada em sentido horário, começando pela borda mais perto da cabeça do animal. O equipamento laser foi acionado por um pedal, e decorrido o tempo T, desligava de forma automática. Os animais foram imobilizados para as aplicações do

laser, sem sedação. Embora o aparelho laser utilizado realize o cálculo de tempo automaticamente, abaixo segue os cálculos para determinar o tempo, necessário para se chegar a densidade de energia (DE) proposta:



**Figura 8** – Aparelho Thera Lase e Suporte de Metal (SILVA, 2003).

### **Fórmula de Dosimetria**

D – Densidade de Potência

P – Potência em mW

$$D = P \times T / 1000 \times A \text{ J/cm}^2$$

T – Tempo de Exposição

A – Área em  $\text{cm}^2$  ( $0,0028\text{cm}^2$  área utilizada da ponta da fibra óptica)

### **Fórmula de Energia**

E – Energia em Joules

P – Potência em mW

$$E = P \times T / 1000$$

T – Tempo em segundos (s)

### 3.9 Agentes Tópicos

Como agentes tópicos, foram utilizados um Fármaco Fotossensibilizante (FS) derivado da Ftalocianina e uma Base Gel Tensora (BG). A aplicação do FS se deu em 3 grupos: **FS** apenas; **Laser + FS**; **Laser + FS + BG** (Quadro 3). Quando associado a outros tratamentos, o fármaco fotossensibilizante sempre foi aplicado em primeiro lugar, tanto com a irradiação do laser como da aplicação da Base Gel Tensora. O FS e a BG quando usados foram aplicados sobre a área da ferida, sempre no mesmo horário, uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos, com as seguintes quantidades: 0,1ml de fármaco fotossensibilizante (FS) e 0,2ml de base gel tensora (BG) (Figura 9). Os animais foram imobilizados para aplicação dos agentes tópicos, sem sedação.

**Quadro 3** – Distribuição dos Grupos e respectivo tratamento (SILVA, 2003).

	FÁRMACO FOTOSENSIBILIZANTE (FS) ML	BASE GEL TENSORA (BG) ML	LASER (DE TOTAL)
<b>CONTROLE</b>	-----	-----	-----
<b>BG</b>	-----	<b>0,2</b>	-----
<b>LASER</b>	-----	-----	<b>10J/cm<sup>2</sup></b>
<b>FS</b>	<b>0,1</b>	-----	-----
<b>LASER + FS</b>	<b>0,1</b>	-----	<b>10J/cm<sup>2</sup></b>
<b>LASER + FS + BG</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>10J/cm<sup>2</sup></b>



**Figura 9** – Agentes Tópicos (FS e BG) e Seringas descartáveis de 1ml (SILVA, 2003).

### 3.10 Obtenção das Amostras

Para obter as amostras experimentais, os animais foram sacrificados no oitavo dia por *overdose* intramuscular de anestésico geral (Zoletil®50, dose de 0,1 ml/100g de peso) e traslocação cervical. O espécime contendo a ferida de cada animal foi removido e fixado em formol a 10% por 24 horas, e a seguir, preparadas para análise histológica segundo técnica convencional.

### 3.11 Procedimento Laboratorial

As lâminas foram processadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia Unimep de Lins – SP. Foram necessários os seguintes materiais: formol 10%; lâminas histológicas (Glasstécnica, 26 x 76 mm); lamínula (Glasstécnica, 24 x 60 mm); para coloração das lâminas: Hematoxilina/eosina (H&E) e Tricrômio de Masson (azul de anilina) para avaliação de colágeno.

### **3.12 Análise – Microscopia Óptica de Luz**

As lâminas histológicas contendo os espécimes do trabalho foram submetidas a avaliação por microscopia de luz no Laboratório de Histologia da Universidade de Brasília (UNB), em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Zulmira Lacavi e Prof<sup>a</sup>. Ms. Selma Kuckelhauf. Na análise foi avaliado o processo de cicatrização na área da ferida, em relação à epiderme e a derme (tecido de granulação, neovascularização, fibroblastos, colágeno, células inflamatórias, presença de reepitelização e remodelação do tecido conjuntivo) com o uso do laser e de substâncias tópicas, ambos isolados e associados entre si.

### **3.13 Aquisição das Imagens Digitais**

As imagens digitais foram adquiridas por um sistema de videomicroscopia, consistindo de câmera digital colorida (JVC – Modelo TK – 1070V), ligada a um microcomputador através de placa de captura digital de imagens PIXEL VIEW PLAY TV PRO.

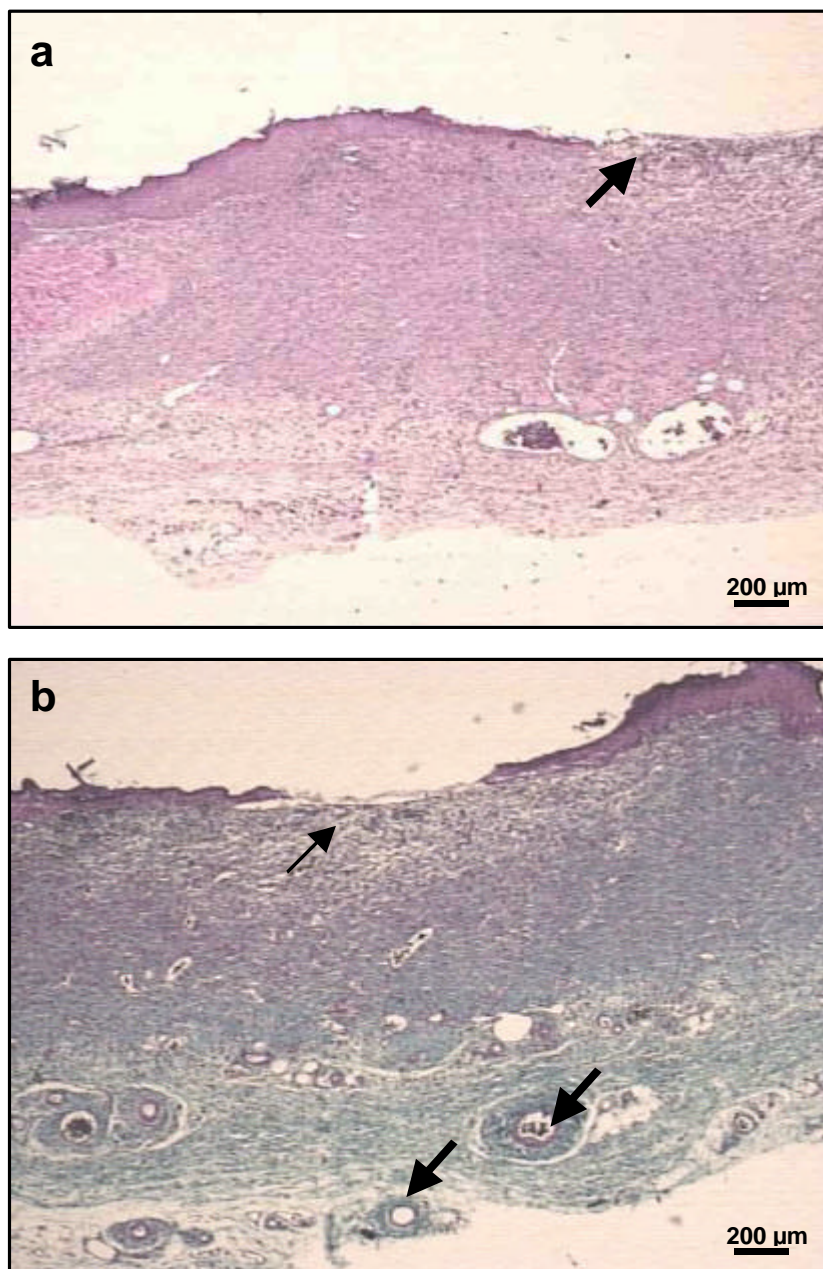
## **4. RESULTADOS**

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Grupo Controle**

Os animais desse grupo apresentaram crosta formada por exsudato fibrinoso coagulado, de aspecto acidófilo, contendo mínimo infiltrado inflamatório, predominantemente granulócitos neutrófilos, íntegros e degenerados. Tecido de granulação com a presença de fibroblastos fusiformes e discreta deposição de matriz extracelular, caracterizada aqui, pela escassa quantidade de fibras colágenas (observadas com corante específico: Tricrômio de Masson - azul de anilina). Todos os animais apresentaram reepitelização inicial discreta, com áreas de acantólise. Apenas um animal apresentou dermatite espongíotica. Nenhum animal desse grupo apresentou indícios de remodelação do tecido conjuntivo (Figura 10).

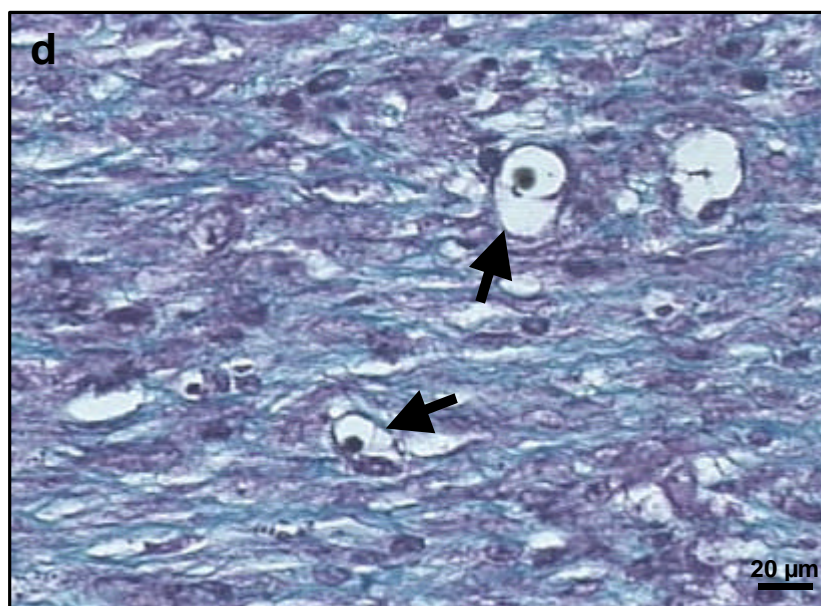
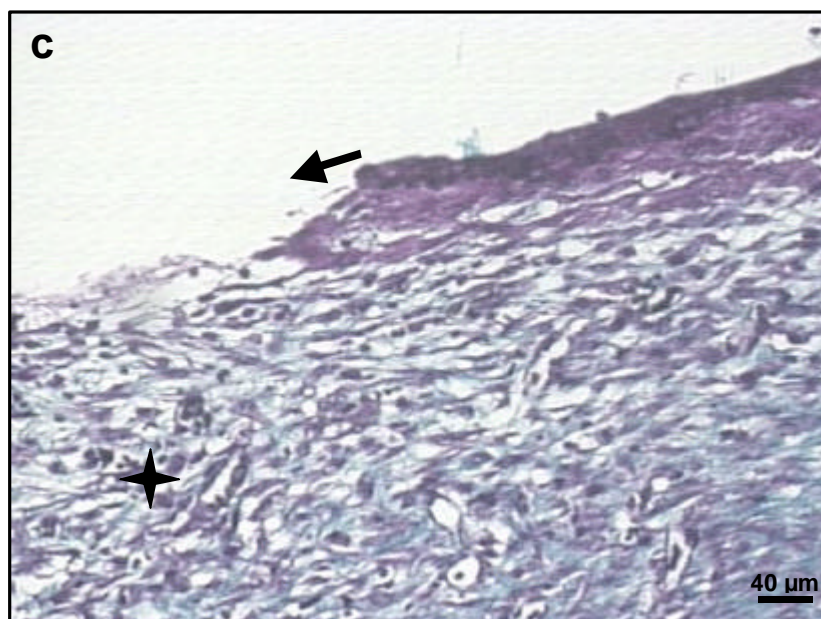




**Figura 10 - Fotomicrografias do Grupo Controle.**

**A** (H&E; 40x) - reepitelização incompleta (seta) e a presença de infiltrado inflamatório na área da ferida;

**b** (Masson; 40x) - área da ferida (seta fina); e neovasos (setas grossas);



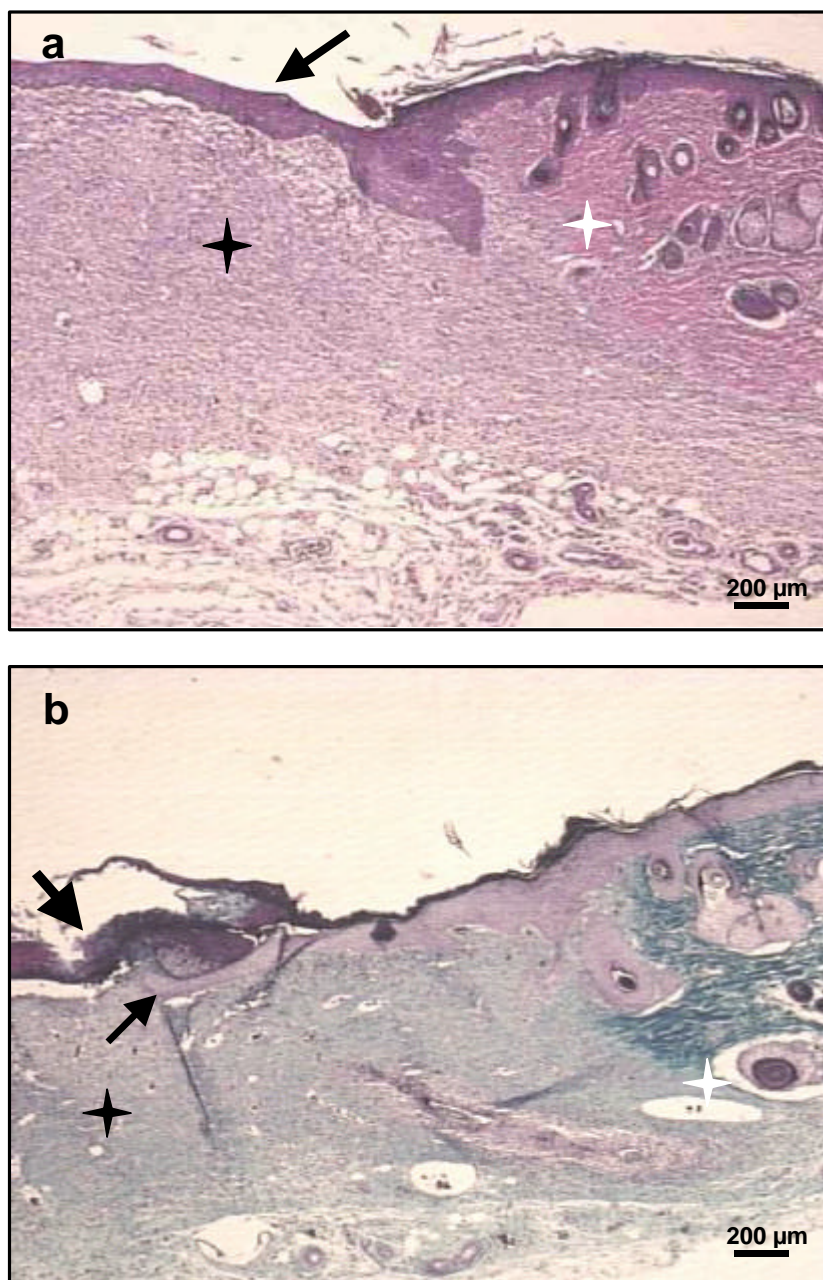
**c** (Masson; 200x) - reepitelização inicial (seta) ; tecido de granulação com a presença de neovasos (estrela).

**d** (Masson; 400x) - tecido de granulação com a presença neovasos (setas).

## **4.2 Grupo Base Gel Tensora (BG)**

Os animais tratados com a base gel tensora (BG) apresentaram crosta formada por exsudato fibrinoso coagulado, de aspecto acidófilo, contendo em seu interior células inflamatórias predominantemente granulócitos neutrófilos, íntegros ou degenerados. Na região subjacente à crosta, tecido de granulação vascularizado de aspecto edematoso, com infiltrado inflamatório mononuclear leve. A proliferação de fibroblastos de núcleo fusiforme foi discreta e pouco expressiva, com uma escassa deposição de matriz extracelular e fibras colágenas. Todos os animais desse grupo apresentaram recuperação epitelial inicial, e oito deles com áreas de acantólise. Entretanto, nenhum deles apresentou indícios de remodelação do tecido conjuntivo (Figura 11).

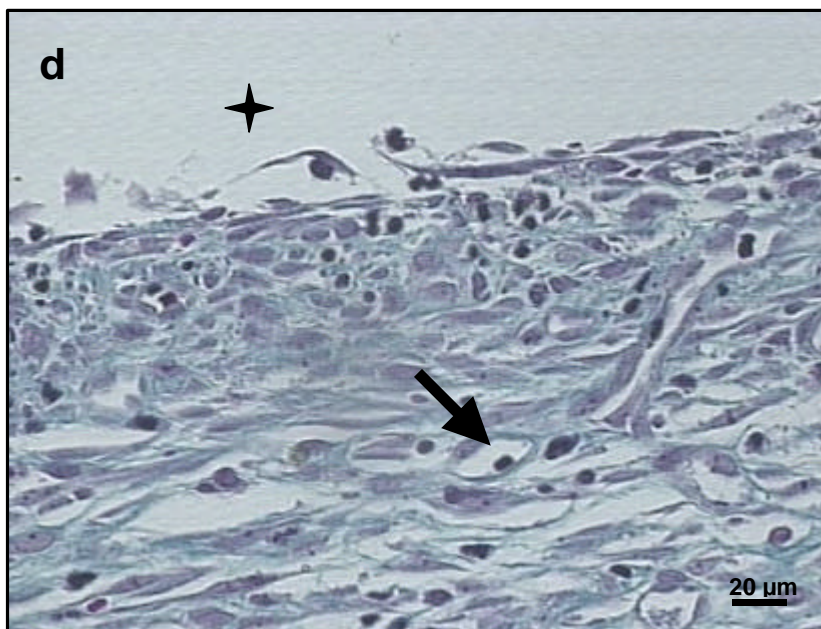
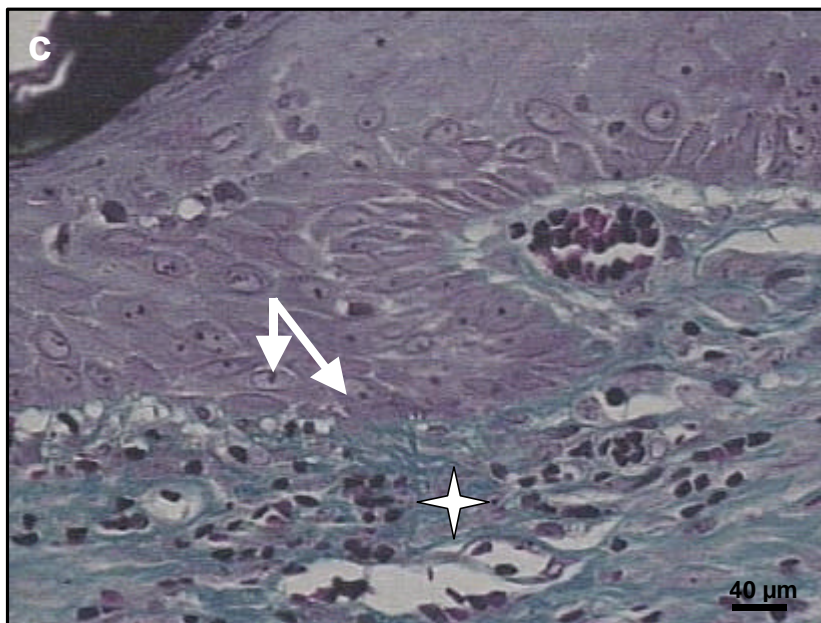




**Figura 11 - Fotomicrografias do Grupo BG**

**a** (H&E; 40x) - formação de epitélio (seta); deposição de tecido de granulação (estrela preta), comparado ao tecido de granulação normal (estrela branca).

**B** (Masson; 40x) - crosta (seta grossa), reepitelização incompleta (seta fina), discreta deposição de colágeno (estrela preta), comparado ao tecido normal, canto superior direito (estrela branca)



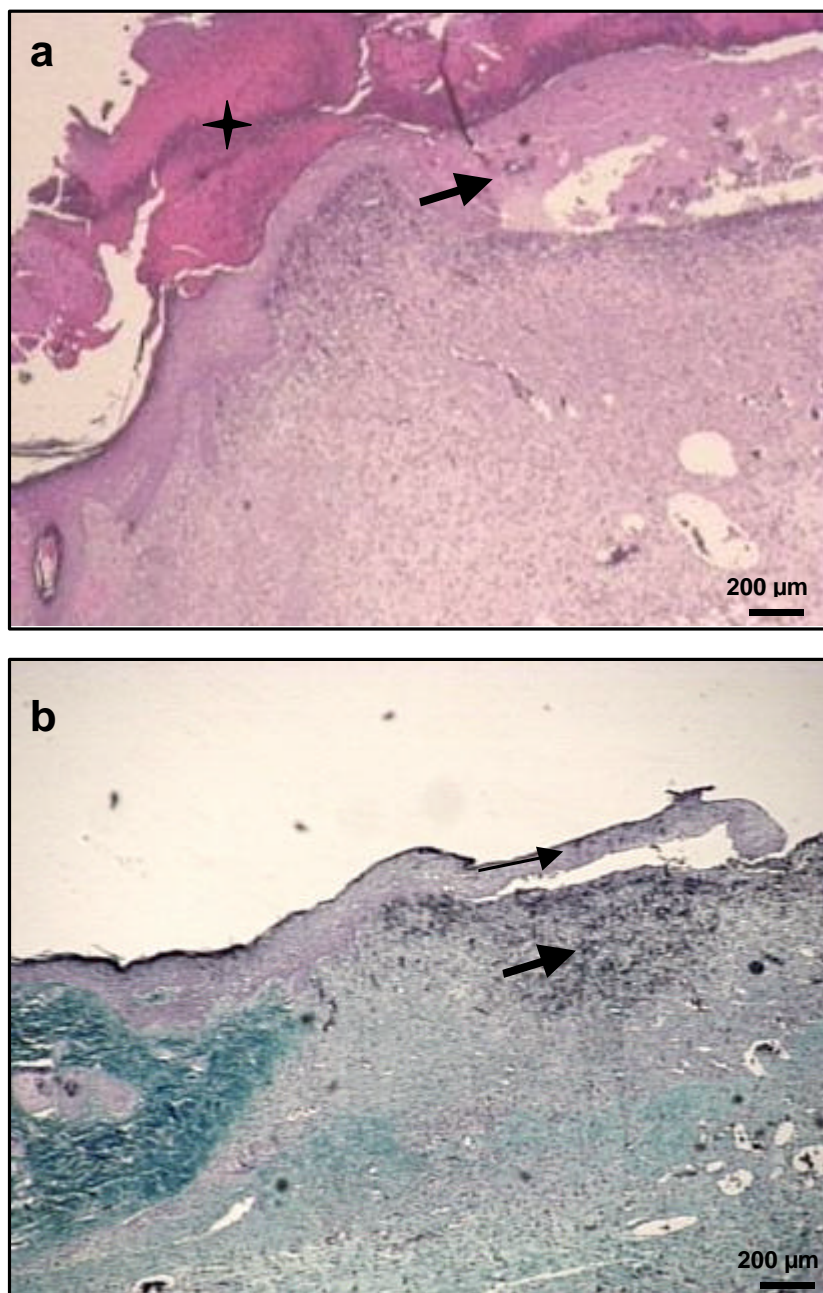
**c** (Masson; 200x) - espessamento epitelial e células epiteliais (setas); tecido de granulação com neovasos (estrela).

**d** (Masson; 400x) - proliferação de neovasos (seta). Fundo azul refere-se à lente azul que fica junto ao condensador do diafragma, na parte inferior da mesa do microscópio (estrela).

### 4.3 Grupo Laser

No grupo irradiado com laser, observou-se, na região subjacente à crosta, de leve a moderado infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares. A proliferação de fibroblastos fusiformes e maior deposição de matriz extracelular, foi caracterizada pela moderada presença de colágeno, sendo de maior evidência em cinco dos animais, e um pouco mais denso quando comparado ao grupo controle. A reepitelização foi de leve a moderada, sendo intensa em dois animais, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Dois animais apresentaram dermatite espongíotica, e edema nos espaços intercelulares da epiderme. Apenas um dos animais apresentou células adiposas, um indício de remodelação do tecido conjuntivo (Figura 12).

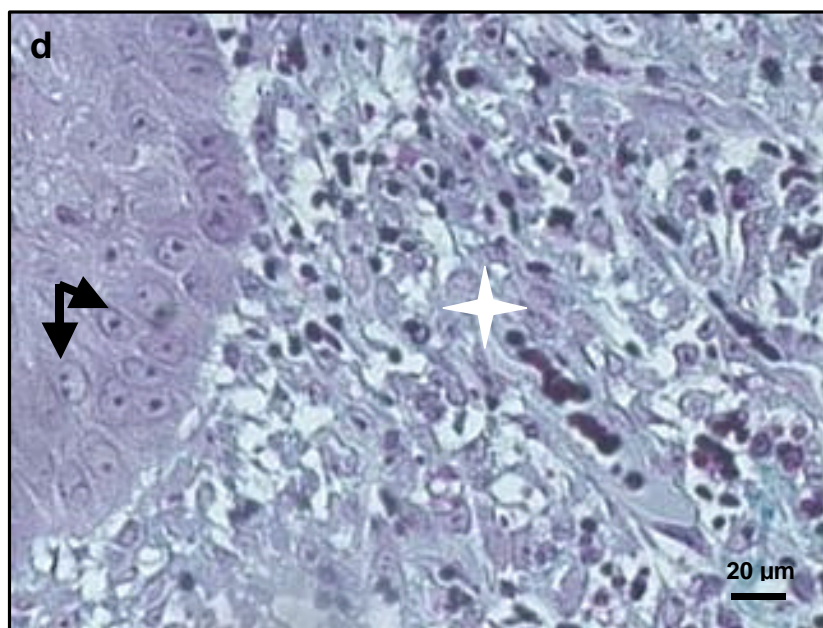
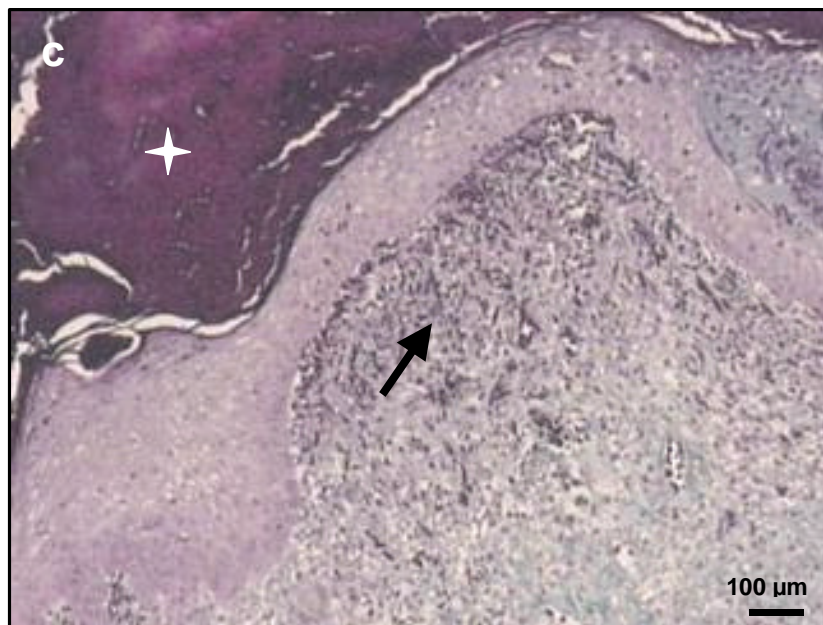




**Figura 12 - Fotomicrografias do Grupo Laser.**

**a** (H&E; 40x) - crosta (estrela); reepitelização incompleta (seta).

**b** (Masson; 40x) - formação de epitélio (seta fina); infiltrado inflamatório na área da ferida (seta grossa).



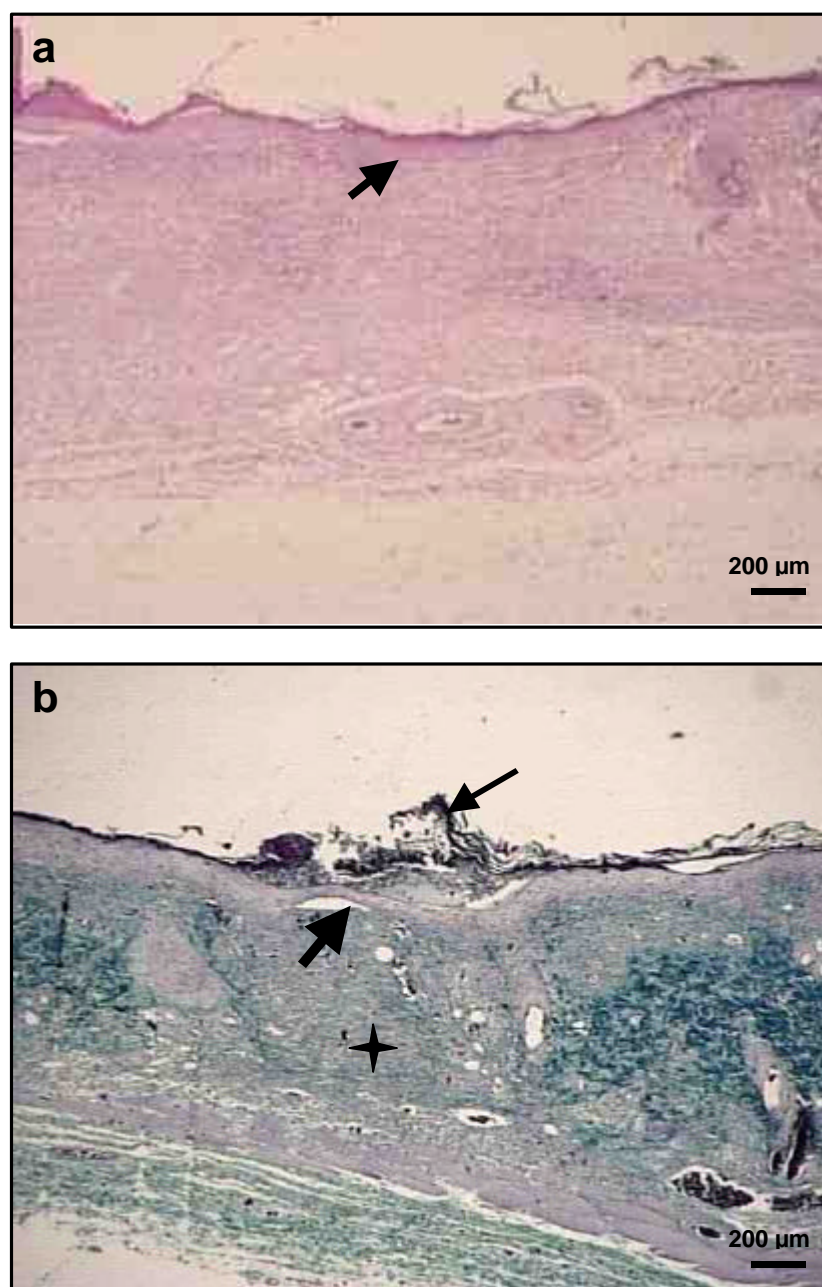
**c** (Masson; 100x) - crosta (estrela); moderado infiltrado inflamatório (seta).

**d** (Masson; 400x) - células epiteliais (setas); tecido de granulação com neovasos (estrela).



#### **4.4 Grupo Fármaco - Fotossensibilizante (FS)**

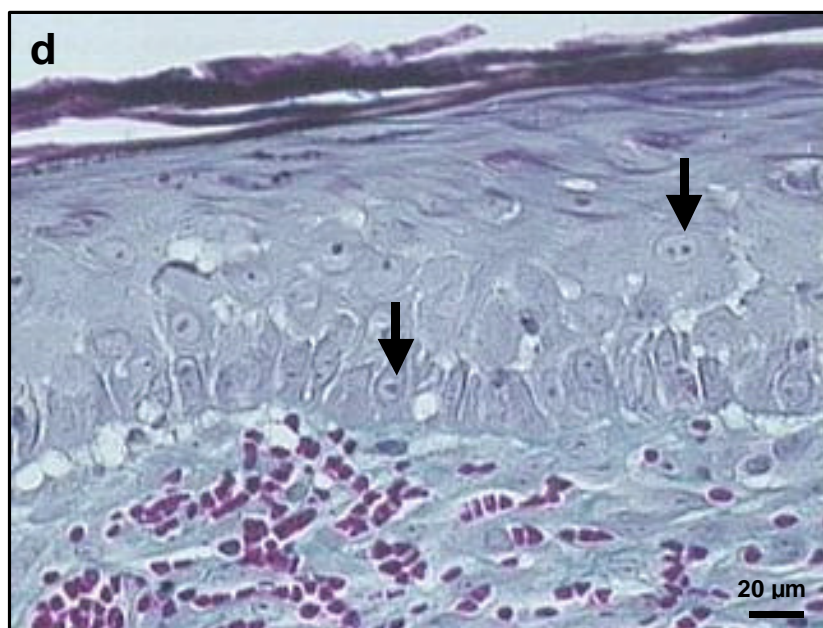
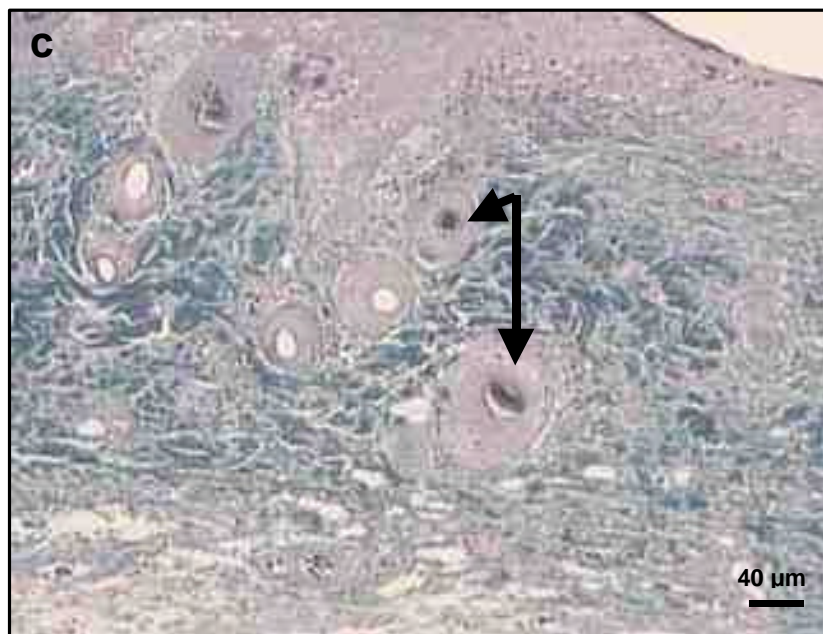
Os animais tratados com o fármaco fotossensibilizante (FS) apresentaram na região subjacente à crosta, de leve a moderado infiltrado inflamatório, constituído, predominantemente, por células mononucleares. Mostraram proliferação fibroblástica fusiforme, com deposição de colágeno variando de moderado a intenso, e mais denso quando comparado ao grupo Controle. Houve indícios de remodelação do tecido conjuntivo em três dos dez animais tratados, a exemplo, por meio de adipócitos. A reepitelização foi de moderada a intensa, com mais da metade da área lesada recoberta por tecido epitelial, e com áreas de acantólise. Em dois animais, observou-se completa reepitelização. Um deles apresentou dermatite espongíotica. Houve discreta presença de exsudato em torno dos neovasos (Figura 13).



**Figura 13 - Fotomicrografias do Grupo FS**

**a** (H&E; 40x) - reepitelização completa (seta).

**b** (Masson; 40x) - crosta (seta fina); reepitelização completa (seta grossa); com moderada deposição de colágeno (estrela).

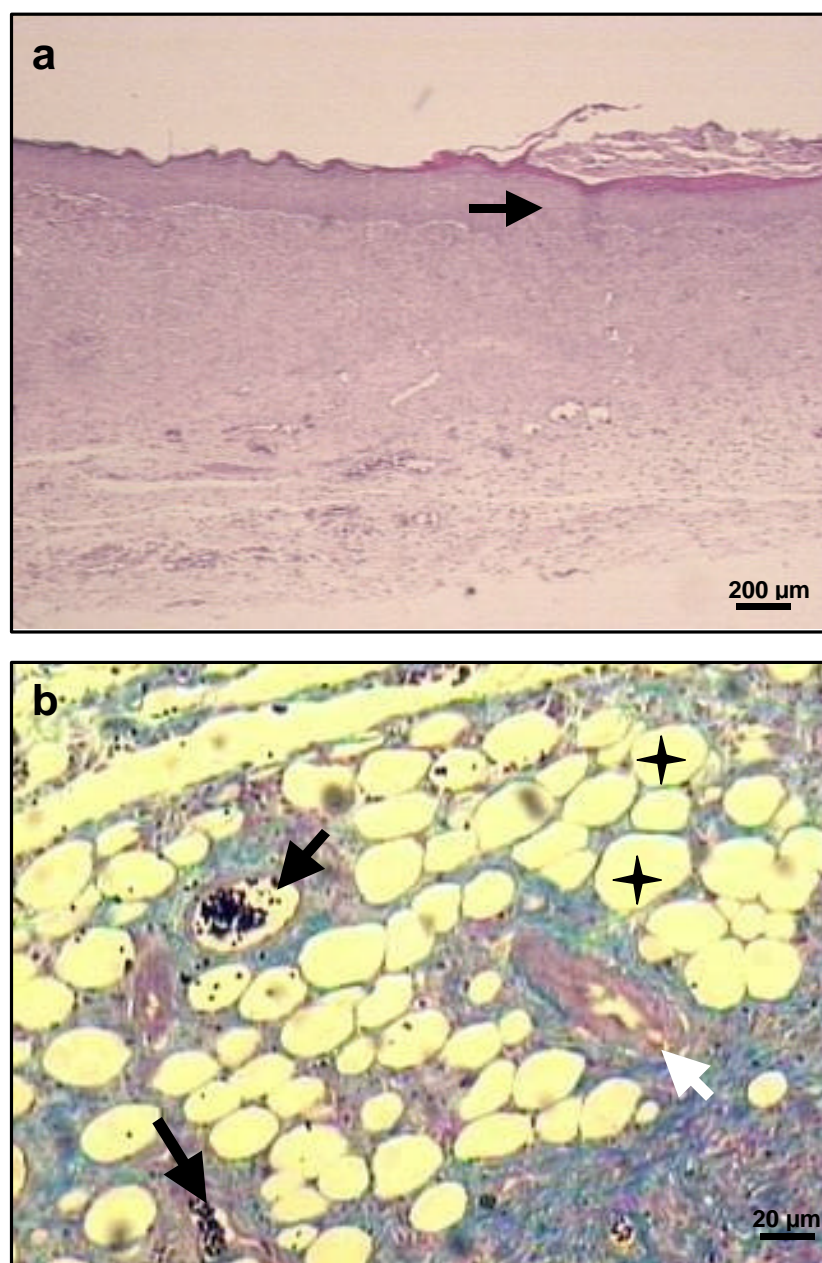


**c** (Masson; 100x) - tecido de granulação com neovasos (setas) rodeado por colágeno.

**d** (Masson; 400x) - células epiteliais (setas).

#### **4.5 Laser associado ao Fármaco - Fotossensibilizante (FS)**

No grupo irradiado com laser associado ao fármaco fotossensibilizante (FS), observou-se, na região subjacente à crosta, de leve a moderado infiltrado inflamatório, sendo intenso em dois animais, com predomínio de células mononucleares. A proliferação de fibroblastos fusiformes e deposição de matriz extracelular, foi caracterizada pela presença moderada de colágeno um pouco mais denso quando comparado ao grupo controle. Todos os animais desse grupo apresentaram reepitelização de moderada a intensa, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Em 2 animais observou-se completa reepitelização. Quatro dos animais apresentaram dermatite espongíotica, com uma leve acantólise. Houve indícios de remodelação do tecido conjuntivo em oito dos animais, predominantemente por meio de adipócitos, e observou-se a presença de tecido glandular e folículo piloso. Apenas um animal apresentou substância amorfa de cor esverdeada envolvida por célula gigante (Figura 14).

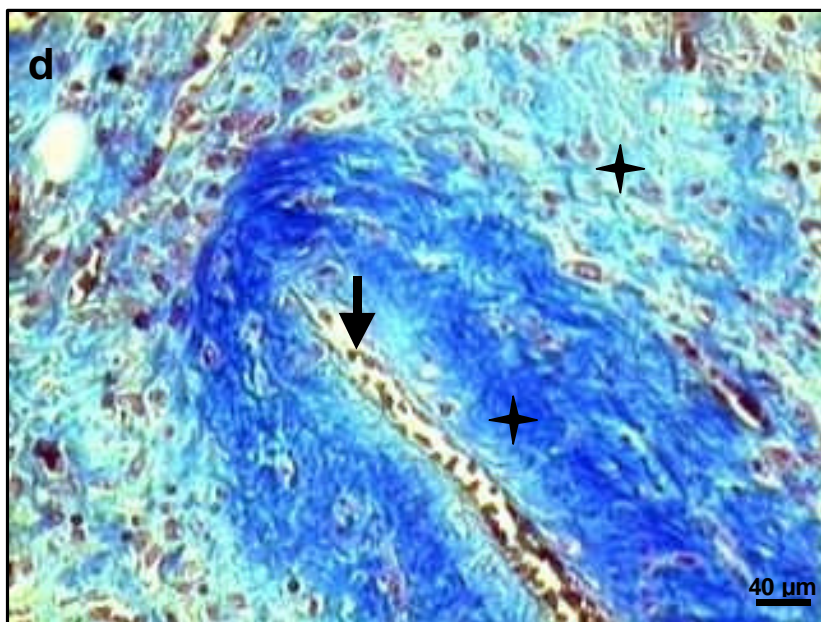
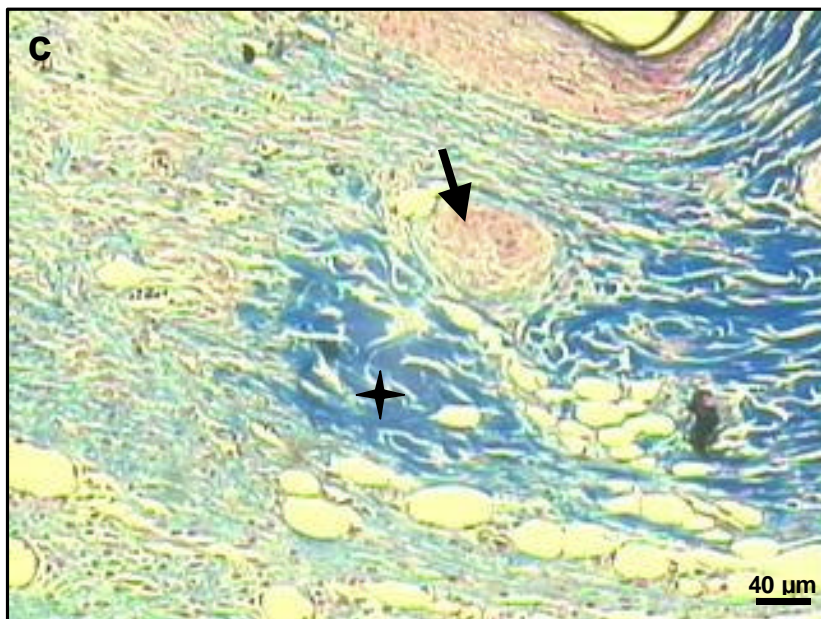


**Figura 14 - Fotomicrografias do Grupo Laser + FS**

**a** (H&E; 40x) - reepitelização completa (seta).

**b** (Masson; 100x) - células adiposas (estrelas); vênulas em formação (setas pretas); arteríola (seta branca). Fundo amarelo refere-se à lente amarela que fica junto ao condensador do diafragma, na parte inferior da mesa do microscópio.



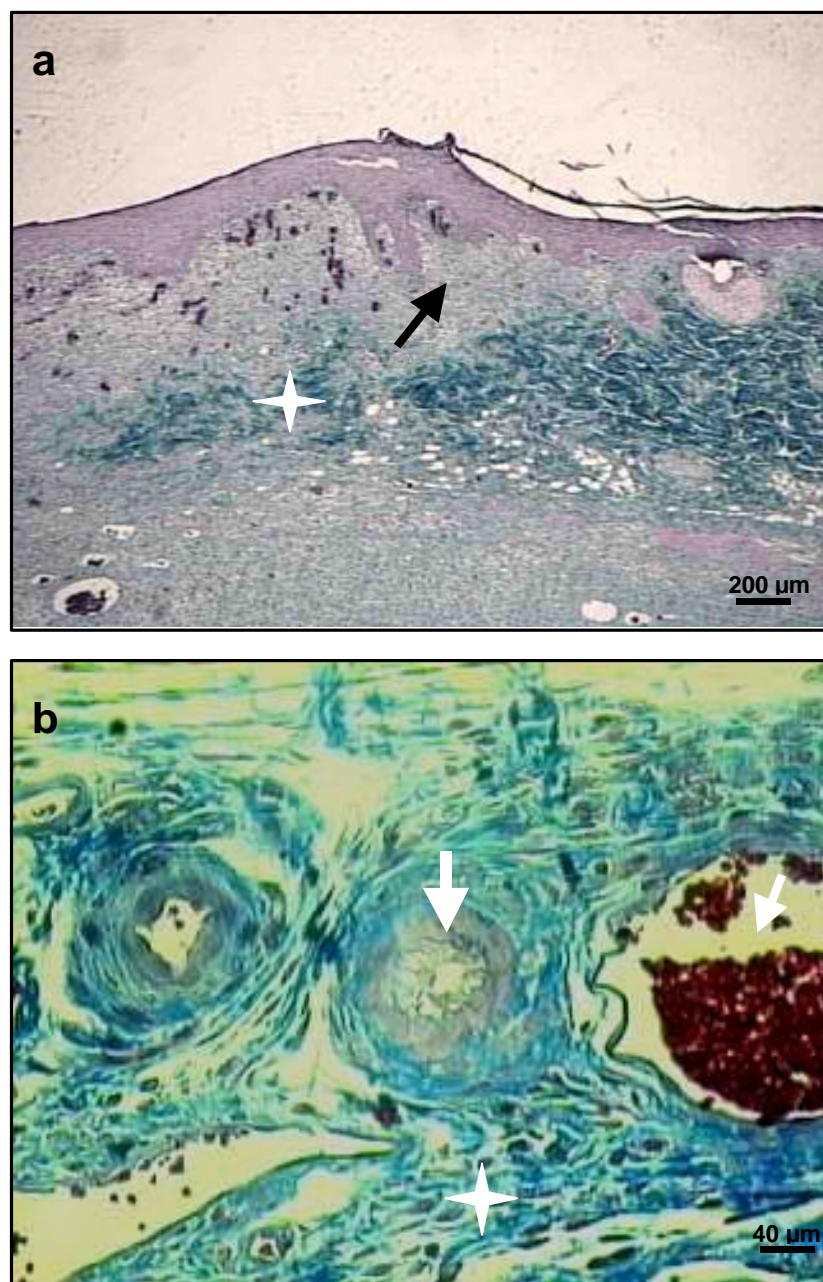


**c** (Masson; 200x) - folículo-piloso em formação (seta); deposição de colágeno (estrela).

**d** (Masson; 200x) - presença moderada de colágeno (estrelas), em especial, ao redor de um neovaso (seta).

#### **4.6 Laser associado ao Fármaco - Fotossensibilizante (FS) e a Base Gel Tensora (BG)**

A exemplo dos outros tratamentos com laser, alguns animais desse grupo apresentaram na região subjacente à crosta, de leve a moderado infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares. A proliferação de fibroblastos fusiformes e deposição de matriz extracelular foi caracterizada pela presença moderada de colágeno, sendo bastante expressiva em cinco dos animais, e um pouco mais denso quando comparado ao grupo controle. A reepitelização variou de moderada a intensa, nesses animais, com aproximadamente mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Observou-se completa reepitelização em um dos animais. Todos os animais apresentaram discreta acantólise e dois deles apresentaram dermatite espongíotica. Houve algum tipo de remodelação do tecido conjuntivo em oito dos animais tratados, e observou-se tecido glandular e folículo piloso (Figura 15).

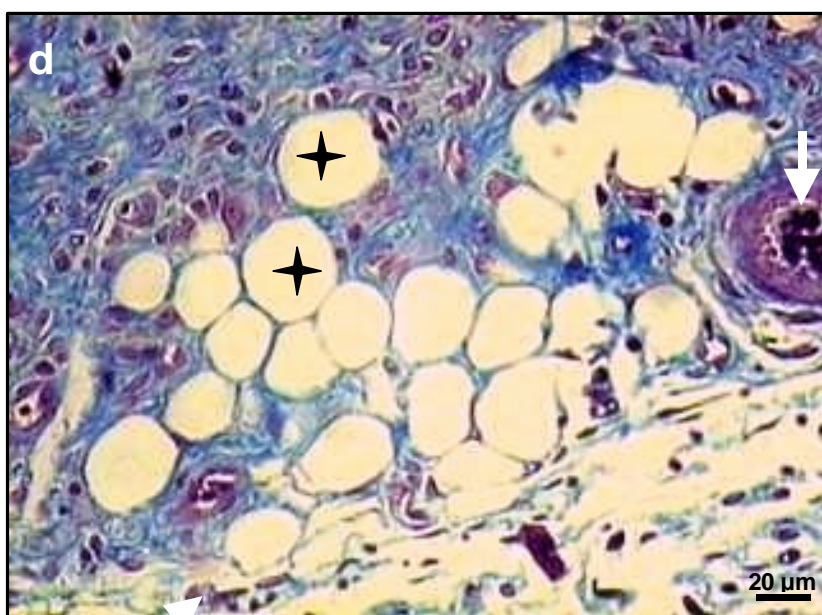
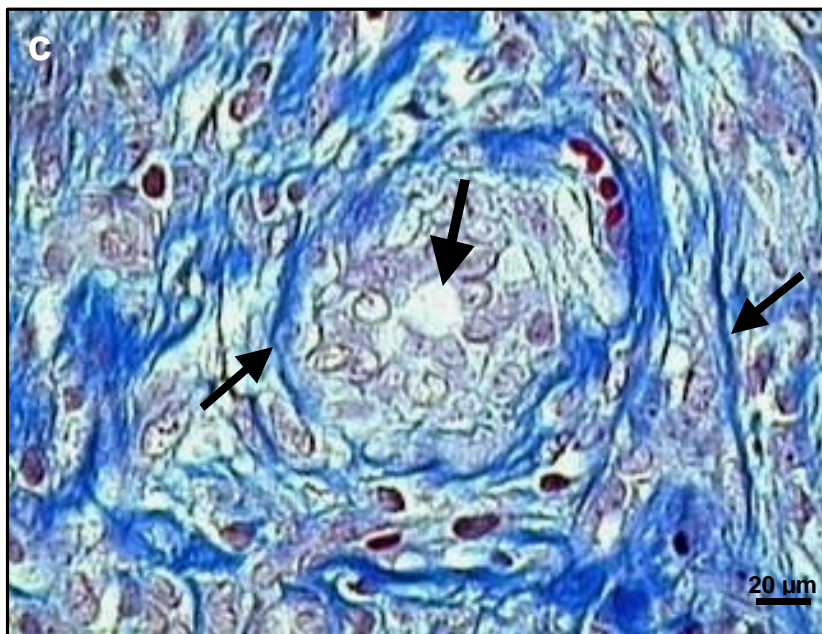


**Figura 15 - Fotomicrografias do Grupo Laser + FS + BG.**

**a** (Masson; 40x) - reepitelização completa (seta); moderada deposição de colágeno (estrela).

**b** (Masson; 200x) - folículo - piloso em formação (seta grossa); vênula e hemácias (seta fina); deposição moderada de colágeno (estrela).





- c** (Masson; 400x) - formação de folículo – piloso ao centro (seta grossa); intensa deposição de fibras colágenas (setas finas).
- d** (Masson; 400x) - células adiposas (estrelas); arteríolas (setas).

## 5. DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

A utilização do Laser na Saúde constituiu área ativa de pesquisas, desde sua descoberta na década de 60. Os efeitos do laser de baixa potência na biomodulação do tecido celular, têm sido estudado por diversos autores (ABERGEL et al., 1984; MESTER; MESTER; MESTER, 1985; KARU, 1989; KIM et al., 1996; HALCIN; UITTO, 1997). A literatura consultada mostra resultados distintos em relação aos efeitos do laser de baixa potência no processo de cicatrização.

Diversos trabalhos relatam a utilização do laser de baixa potência em processos de cicatrização, com efeitos positivos em feridas de pele. Vários foram os trabalhos desenvolvidos, tanto **In Vitro** (ABERGEL et al.; 1984; PASSARELA et al., 1984; RIGAU, 1996; GROSSMAN et al. 1998; KARU, 1999; STADLER et al.; 2000; ALMEIDA-LOPES et al.; 2001) como **In Vivo** (KANA et al.; 1981; BASFORD, 1995; TATURANAS, 1998; SIMUNOVIC; IVANKOVICH; DEPOLO, 2000; AL-WATBAN, 2001; LAGAN et al.; 2002). Alguns autores relatam resultados negativos sobre o processo de cicatrização com o uso dessa terapia (MALM; LUNDEBERG, 1991; HALL, 1994; WALKER, 2000; YILMAZ, 2002).

Estudos são desenvolvidos e direcionados para promover um ambiente de cicatrização total em feridas, com a aplicação de substâncias que reduzam os efeitos de contaminação e favoreçam o processo cicatricial (ARAÚJO et al., 1998; VON KOSSEL et al., 2000; MINOSSI et al., 2001; HAMBLIN et al., 2002). Uma razão para as discrepâncias nos resultados encontrados pode ser devido a comum variedade na escolha do animal experimental utilizado, o tipo e tamanho da ferida, método de avaliação dos resultados, diferenças no comprimento de onda e fluências do laser, e as condições de tratamento (YU; NAIM; LANZAFAME, 1997). Os lasers com comprimento de onda na região visível do espectro eletromagnético foram os mais utilizados nas pesquisas de cicatrização de feridas. (BAXTER, 1991; ALMEIDA-LOPES, 1999). Atualmente existem os

lasers de diodo, uma alternativa de custo intermediário, que cobre todo o espectro visível e infravermelho próximo. (MACHADO, 2000).

A terapia fotodinâmica (TFD) vem se destacando no meio científico para tratamentos de doenças neoplásicas e não-neoplásicas (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; SIBATA et al., 2000). Sua eficácia depende de vários fatores: estrutura e espectro de absorção do fotossensibilizante, modo de administração, fonte de luz utilizada, comprimento de onda, profundidade de penetração da luz ativadora e resposta biológica do tecido.

A TFD está sendo integrada em regimes multimodais, com a vantagem distinta de poder ser repetida múltiplas vezes. Tem sido observado que a TFD é potencialmente útil em outras aplicações, a fotossensibilização foi primeiramente observada em enzimas, vírus, células, animais e plantas. Há, ainda, um número de aplicações não oncológicas nas quais a TFD está sendo avaliada. Estão sendo feitos testes pré-clínicos e clínicos para avaliar sua capacidade de inativar vírus, modular a função imunológica em doenças autoimunes, tratar lesões ateroscleróticas, e também tratar dermatoses tais como acne, hirsutismo, psoríase (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995).

Os resultados da presente pesquisa mostraram que a cicatrização das feridas excisionais na pele de rato, dos animais do **Grupo Controle** evoluíram com características convencionais para um processo de cicatrização por segunda intenção, embora, os grupos experimentais evidenciassem uma tendência à completa cicatrização das feridas, os mesmos, apresentaram diferenças entre si, e quando comparado com os animais controle. As feridas controle apresentaram leve infiltrado inflamatório e discreto tecido de granulação. A proliferação de fibroblastos de núcleo fusiforme foi discreta e pouco expressiva em relação aos demais grupos. A análise histológica mostrou a presença de crosta, formada por exsudato fibrinoso coagulado de aspecto acidófilo em todos os grupos ao final do período experimental de sete dias.

A cicatrização é um processo complicado, requer interações complexas entre células, fatores de crescimento, citocinas, e matriz extracelular. Tradicionalmente, o processo inflamatório tem sido dividido em três fases, enfatizando diferentes componentes no sistema. A fase inflamatória é iniciada pela interrupção dos vasos sanguíneos. Degranulação de plaquetas, e citocinas latentes são encontradas na matriz extracelular tal como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), e a transformação de fatores de crescimento são ativados (TGF), neutrófilos, monócitos, e macrófagos entram na área local. De um a dez dias depois do início da fase inflamatória, a fase proliferativa/tecido de granulação é iniciada. A proliferação de fibroblastos e um frouxo tecido conectivo são depositados, liberação de macrófagos, angiogênese e reepitelização ocorrem, e o aparecimento de miofibroblastos. Finalmente, durante a formação da matriz e fase de remodelação, a matriz extracelular é degradada por enzimas, o colágeno é acumulado e organizado, e os miofibroblastos fazem a contração da ferida (PAREKH et.al., 1999).

Os animais do **Grupo Base Gel Tensora (BG)** evoluíram com características convencionais para um processo de cicatrização por segunda intenção e histologicamente semelhante ao grupo Controle. Houve uma população fibroblástica com núcleo fusiforme pouco expressiva, tecido de granulação vascularizado de aspecto edematoso, e discreta deposição de matriz extracelular. A recuperação epitelial inicial foi observada em todos os animais, juntamente com áreas de acantólise. Não houve indícios de remodelação do tecido conjuntivo.

O processo inflamatório foi semelhante em todos os grupos onde o laser foi utilizado. Os animais do **Grupo Laser** apresentaram infiltrado inflamatório que variou de leve a moderado, com predomínio de células mononucleares. Este aspecto concorda com os resultados histológicos encontrados por outros autores, que observaram uma proliferação de células, com predominância de células inflamatórias presentes ainda até o décimo dia (YU; NAIM; LANZAFAME, 1997).

Observou-se dermatite espongiosa em dois animais, e edema nos espaços intercelulares da epiderme. A reepitelização variou de leve a moderada, sendo intensa em dois animais, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Apenas um animal apresentou células adiposas, um indício de remodelação do tecido conjuntivo. Por outro lado, houve uma maior deposição de matriz extracelular, e a proliferação de fibroblastos fusiformes foi caracterizada por moderada presença de colágeno, um pouco mais denso quando comparado ao grupo Controle. Fato este, já evidenciado por estudos anteriores, indicando uma atividade fibroblástica proliferativa maior com o uso do laser *In Vivo* e *In Vitro* (RIGAU, 1996; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HOUGHTON; BROWN, 1999).

A proliferação de fibroblastos é um aspecto que pode representar a manifestação do efeito do laser sobre o tecido endotelial, o qual poderia ser resultante de uma maior liberação de mediadores químicos da proliferação celular, já citado em outros estudos (ABERGEL et al., 1984; KARU, 1995; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; KARU, 1999). A presença de células jovens, os fibroblastos, é um outro indício da aceleração do processo cicatricial, e até indícios de uma pavimentação epitelial, último processo da cicatrização.

O uso do laser de baixa potência produziu uma alta proliferação fibroblástica em gengiva humana *in vitro*, com fluência de  $2\text{J}/\text{cm}^2$ , e com um pequeno tempo de exposição da radiação (ALMEIDA-LOPES, et al., 2001). Em um estudo *in vivo*, realizado em ratos normais, os autores enfocaram a dosimetria de vários comprimentos de onda laser e o uso de drogas, e através dos resultados foi possível observar que os efeitos da exposição laser foram dependentes da dose, dando efeitos de estimulação ( $2\text{-}16\text{J}/\text{cm}^2$ ), bioativação zero ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ ) e inibição ( $24\text{-}28\text{J}/\text{cm}^2$ ) (AL-WATBAN et al., 2000).

Os resultados evidenciaram o efeito biomodulador positivo da laserterapia na cicatrização de feridas, confirmando os achados de outros autores (HOUGHTON; BROWN, 1999; AL-WATBAN et al., 2000; SIMUNOVIC et al., 2000). Estudos anteriores relatam que o laser de baixa intensidade tem sido

usado para estimular a fase proliferativa da cicatrização (KANA et al., 1981; MESTER et al., 1985). Embora, estes estudos tenham mostrado o progresso isolado em vários estágios da cicatrização, poucos porém, têm mostrado algum efeito benéfico em razão global da cicatrização (YU; NAIM; LANZAFAME, 1997).

Um mecanismo proposto pelo qual o laser de baixa intensidade estimula o processo de cicatrização é pela absorção da energia da luz pela mitocôndria, a qual aumenta a energia da célula e estimula a liberação de mediadores químicos (MESTER et al., 1985; LICHTENSTEIN et al., 1999). Os efeitos bioestimulativos de vários lasers no espectro de luz visível foram recentemente atribuídos pela quantidade minuto de indução da luz na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora altas concentrações de ROS causem a morte de células (por depleção de ATP e peroxidação lipídica), evidências recentes demonstram que concentrações controladas e relativamente baixas de ROS desempenham um papel importante na ativação de muitos processos celulares. Por exemplo, ROS estimula proliferação de fibroblastos (MURREL, 1990 *apud* LUBART, 1999). Então, ROS não deveriam ser somente vistos como agentes que causem danos as células, mas também, por poder serem mediadores de funções fisiológicas (LUBART, 1999).

Nos animais do **Grupo Fármaco Fotossensibilizante (FS)**, observou-se infiltrado inflamatório de leve a moderado, com predominância de células mononucleares. Foi evidenciada uma discreta presença de exsudato em torno dos vasos, e a proliferação de fibroblastos fusiformes com deposição de colágeno foi de moderado a intensa, predominantemente de aspecto mais denso e em maior quantidade que no grupo Controle. Houve indícios de remodelação do tecido conjuntivo em três animais, a exemplo, por meio de adipócitos. A reepitelização variou de moderada a intensa, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. A completa reepitelização foi observada em 2 animais.

No **Grupo Laser associado ao Fármaco Fotossensibilizante (FS)**, observou-se de leve a moderado infiltrado inflamatório, sendo intenso em dois animais, com predomínio de células mononucleares. A proliferação de fibroblastos fusiformes e deposição de matriz extracelular foi caracterizada pela presença moderada de colágeno e um pouco mais denso quando comparado ao grupo Controle. A reepitelização foi evidente em todos os animais desse grupo experimental, variando de moderada a intensa, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Em dois animais observou-se completa reepitelização. A dermatite espongíotica foi identificada em quatro animais, com leve acantólise. Houve indícios de remodelação do tecido conjuntivo em oito animais, predominantemente por meio de adipócitos. Observou-se a presença de tecido glandular e folículo piloso, características estas, também citada em resultados histológicos de outros autores, em estudo da Modulação Fotodinâmica da Cicatrização com Fotossensibilizadores (PAREKH et al., 1999).

Existem algumas literaturas que reportam que a TFD mediada pela administração sistêmica de fotossensibilizador causa inibição na cicatrização (McCAW et al., 2001; KUBLER et al., 1996). Entretanto, outro trabalho mostra a aceleração do processo (JAYASREE et al., 2001).

Uma produção adicional como alternativa e mais modelos de situações de cicatrização, poderiam ser benéficas para examinar histologicamente as feridas, e para detectar diferenças de potencial em nível celular e entre os grupos controle e experimentais (WALKER, et.al., 2000). Portanto, trabalhos futuros nesta área também deveriam envolver a caracterização de modelos de cicatrização seguidos de terapia com laser de baixa intensidade.

No **Grupo Laser associado ao Fármaco Fotossensibilizante (FS) e a Base Gel Tensora (BG)**, os resultados histológicos apresentaram-se semelhantes ao grupo Laser associado ao FS. Observou-se um infiltrado inflamatório de leve a moderado, com predomínio de células mononucleares. A presença de uma matriz extracelular melhor desenvolvida, e a proliferação de



fibroblastos fusiformes foi caracterizada por uma quantidade maior de colágeno, um pouco mais denso quando comparado ao grupo controle, sendo bem pronunciada em cinco dos animais. A reepitelização variou de moderada a intensa em todos os animais, com mais da metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. Observou-se completa reepitelização em um dos animais. Todos os animais apresentaram discreta acantólise, e dois deles com dermatite espongíotica. Houve remodelação do tecido conjuntivo em oito animais, por meio de adipócitos. A presença de tecido glandular e folículo piloso, também foi evidenciada nesse grupo, características essas, citadas por outros autores (PAREKH et. al., 1999).

Os resultados encontrados no **Grupo FS**, no **Grupo Laser associado FS**, e no **Grupo Laser associado ao FS e a BG**, indicam uma maior aceleração do processo de cicatrização quando comparado com o grupo Controle e demais grupos já citados, seja pela maior quantidade de colágeno depositada em uma matriz extracelular mais desenvolvida, ou seja, por uma maior remodelação do tecido conjuntivo observado, prevalecendo nestes dois últimos grupos.

O processo de reepitelização foi mais avançado nos grupos experimentais, em relação ao grupo Controle. Porém, no **Grupo Fármaco - Fotossensibilizante (FS)**, **Grupo Laser associado FS** e no **Grupo Laser associado ao FS e a BG**, observou-se reepitelização que variou de moderada a intensa, apresentando metade da área da ferida recoberta por tecido epitelial. No **Grupo FS** e **Grupo Laser associado FS**, além de moderada a intensa, foi possível observar em cada grupo, uma completa reepitelização em dois animais. Já, no **Grupo Laser + FS + BG**, observou-se completa reepitelização em um dos animais. Histologicamente, a reepitelização nesses grupos se mostrou mais avançada. No **Grupo Laser**, a reepitelização foi mais desenvolvida quando comparado ao grupo Controle a ao grupo BG. A dermatite espongíotica foi evidenciada em maior número de animais quando o Laser foi utilizado, sendo predominante no grupo Laser associado ao FS.

A irradiação com luz visível vermelha e monocromática, pode aumentar o processo metabólico das células, sendo que, os efeitos fotobiológicos da estimulação dependem do comprimento de onda, dose e intensidade da luz (KARU, 1989). A luz laser de baixa potência na região do vermelho e região do infravermelho próximo corresponde sem dúvida com a energia característica e níveis de absorção relacionada com a cadeia respiratória. Isso indica que centros de reação da luz laser de baixa potência neste caminho de energia eletromagnética, estimula componentes também chamados de pigmento-antena da cadeia respiratória e, portanto, vitaliza as células por aumento na produção de ATP mitocondrial.

Mester et al., (1985), avaliando os efeitos do laser Ruby, Hélio-Neônio e Argônio, referem que dosagens altas têm efeito inibidor. Baixas doses de laser utilizadas (0.23, 2,75, 3.66 J/cm<sup>2</sup>) num processo de cicatrização, foram associadas com altas quantidades de deposição de colágeno dentro da região da ferida (HOUGHTON; BROWN, 1999). A irradiação laser, com densidade de energia apropriada, é capaz de atuar dentro do ambiente local da ferida, alterar as atividades celulares e componentes do tecido, e resultar em aumento na deposição de colágeno e aceleração no fechamento da ferida. Esses dados sugerem que a laserterapia é capaz de fotoestimar o tecido lesado para produzir efeitos positivos na cicatrização.

A potencial aplicação da TFD na cicatrização e formação de cicatriz não tem sido bem explorado. Nossos resultados indicaram que a TFD não causou nenhuma inibição no processo de cicatrização, concordando com os resultados de outros autores (HAMBLIN et al., 2002). Os autores concluíram que as feridas tratadas com TFD realmente cicatrizaram um tanto mais rápido em relação às feridas controles, embora os resultados não demonstrassem diferenças histológicas aparentes, isso pode ser justificado pela aplicação de uma única dose de TFD administrada nas feridas experimentais.

O laser de baixa potência é sugerido com o fim de otimizar o processo cicatricial (ABERGEL et.al., 1984), e a terapia fotodinâmica (TDF) não causou nenhuma inibição no processo de cicatrização de feridas de pele (HAMBLIN et al., 2002), podendo até levar a uma aceleração desse processo (JAYASREE et.al., 2002). Através dos resultados obtidos nessa pesquisa é possível verificar que o processo de cicatrização utilizando Laser de Baixa Potência, com uma baixa fluência associada à Fármaco Fotossensibilizante (FS) não inibiu nenhuma fase do processo de cicatrização, apresentando resultados histológicos mais desenvolvidos em relação aos demais grupos. A associação da Base Gel Tensora (BG) ao Laser e ao Fármaco Fotossensibilizante, não apresentou diferenças relevantes em relação ao grupo Laser associado ao FS, uma vez que, serviu apenas de curativo para a ferida, por não apresentar componentes ativos na sua formulação.

Múltiplas doses de tratamento de TFD com variação no intervalo de tempo, poderão promover alterações mais eficazes na cicatrização e formação de cicatriz. Os resultados desse estudo indicam um possível uso dessa metodologia no controle rápido de feridas e mesmo em outras lesões locais.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

1. Em geral, o processo de cicatrização no **Grupo Controle** e **Grupos Experimentais** indicaram uma evolução das feridas dentro das características convencionais de normalidade.
2. A **TFD** não causou nenhuma inibição e nenhum prejuízo no processo de cicatrização. As feridas tratadas com **TFD** mostraram um processo de cicatrização mais avançado em relação as feridas controles.
3. Os animais dos Grupos Experimentais (**Laser; FS; Laser + FS; Laser + FS + BG**) apresentaram uma maior quantidade de colágeno e um pouco mais denso quando comparado aos animais do Grupo Controle e Grupo BG.
4. Uma reepitelização mais avançada foi observada nos animais dos grupos experimentais, sendo mais evidente no **grupo FS, grupo Laser + FS e grupo Laser + FS + BG**.
5. A remodelação do tecido conjuntivo foi mais incidente nos **Grupos Laser + FS e Grupo Laser + FS + BG**.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERGEL, R. P.; MEEKER, C. A .; LAM, T. S.; DWYER, R. M.; LESAVOY, M. A .; UITTO, J. Control of connective tissue metabolism by lasers: Recent developments and future prospects. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 11, n. 6, p. 1142-1150, 1984.

ABT, E. Biostimulation and Photodynamic Therapy. In: MISERENDINO, L.J.; PICK, R.M. **Lasers in Dentistry**, Chicago: Quintessence books, 1995, p. 247-257, cap. 17.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com laser de Baixa potência**. 1999. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP.

ALMEIDA- LOPES, L.et al. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 29, p. 179-184, 2001.

AL-WATBAN, F.A . H.; ZHANG, X.Y. The Acceleration of Wound Healing is not Attributed to laser Skin Transmission. **Laser Therapy**. v.11, n.1, p. 6-10, 1999.

AL-WATBAN, F. A .H.; ANDRES, B. Laser Photons and Pharmacological Treatment in Wound Healing. **Laser Therapy**. v. 12, p. 3-12, 2000.

AL-WATBAN, F. A .H.; ANDRES, B.L.; ZHANG, X. Wound Healing Efficacy of Hene Laser (632.8nm) and Pharmacological Treatments in Normal Rats. **Lasers in the Life Sciences**. v.9, p. 245 - 254, 2001.

ANDRADE, Z. A . Tecido Conjuntivo, Reparo, Regeneração e Cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M.; **Patologia Processos Gerais**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 135- 151, cap. 8.

ARAÚJO, C. F. R. et al. Efeitos do Agarol e do Trigliceril® sobre a Cicatrização de Pele. Estudo experimental em Ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 4, 1998. Disponível em: [http:// www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86501998000400006&1ng=en&nr=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000400006&1ng=en&nr=iso). Acesso em: 11 maio 2002.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns**. v. 27, p. 534-544, 2001.

BASFORD, J.R. Low Intensity Laser Therapy: Still Not na Established Clinical Tool. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BAXTER, G.D.et al. Low Level Laser Therapy: Current Clinical Practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**. v.77, n.3, p. 171-178, 1991.

BEN-HUR, E.; ROSETHAL, I. The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. **Journal of Radiation Biology**. v.47, n.2, p.145-147, 1985.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P. et al. Hormônio de Crescimento e a Concentração de Colágeno na Cicatrização de Feridas Cutâneas de Ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n.2, 2000. Disponível em: [http:// www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86501998000200004&1ng=en&nrm](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000200004&1ng=en&nrm). Acesso em: 21 mar. 2002.

BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M., I.; COUPPÈ, C. **Clinical Electrtherapy- Your Guide to Optimal Treatment**. Norway: Norwegian Academic Press, 2001. p.39-44; 134-148, cap. 5, 16.



BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Science , 2000, p. 1-13, cap.1.

BRASILEIRO FILHO et al. **Bogliolo Patologia Geral**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 73-77; 1030- 1032, cap. 6, 31.

BUCHANAN, R.B.et.al. Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumors of the skin and head and neck. **Journal of Surgical Oncology**. v.15, pp. 400-406, 1989.

CASTRO, D.J.; SAXTON, R.E.; SOUDANT, J. Phototherapy with Lasers and Dyes. In: CLAYMAN, L.; KUO, P. **Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry**. New York: Thieme, 1997. p.137-142, cap. 11.

CATONE, G.A .; HALUSIC JR, E. Photobiology of Lasers in Oral and Maxillofacial Surgery. In: CATONE, G.A .; ALLING, C.C. **Laser Applications in Oral and Maxillofacial Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997, p. 29-43, cap. 2.

CLARK, R. A .F. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2ed. New York: Plenum Press, 1996. p. 311- 368, cap. 9,10, 11.

CORDERO, A . A .; **Biologia de la Piel**. São Paulo: Panamericana, 1996. 106p.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44- 78; 79-100, cap. 3, 4.

DORGHERTY, T.J. et al. Photoradiation Therapy : Cure of Animal Tumors with Hematoporphyrin and Light. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 55, n.1, p. 115-121, 1975.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **American Association for Cancer Research**. v.38, p. 2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photoradiation in the Treatment of Recurrent Breast Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**. v.62, n.2, p. 231-237, 1979.

DOUGHERTY, T.J. Na Update on Photodynamic Therapy Application. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v. 20, n.1, p. 3-7, 2002.

DUARTE, Y., A ., O .; D'ELBOUX DIOGO, M. J. **Atendimento Domiciliar: Um Enfoque Gerontológico**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.265-306, cap. 21.

ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO. São Paulo, 2003. Disponível em : <http://www.fai.unne.edu.ar/biologia/images/espectro.gif> Acesso em: 25 abr. 2003

FISHER, A .M.R.; MURPHREE, A .L.; GOMER, C. Clinical and Preclinical Photodynamic Therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 17, p. 2-31, 1995.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L.; **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 253- 266, cap. 14.

GENOVESE, W.J. **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000, 175p.

GIUSEPPE, T. Low Power Laser Therapy and Analgesic Action. **Journal of Clinical laser medicine & Surgery**. v.17, n.1, p. 29-33, 1999.

GRAY, H. As Bases da Física do Laser de Dióxido de Carbono e Interação Tecidual. In: BADIN, A . Z.D.; MORAES, L.M.; ROBERTS III, T.L. **Rejuvenescimento Facial a Laser**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, p. 1- 8, cap. 1.

GROSSMAN, N. et al. 780 nm Low Power Diode laser Irradiation Stimulates Proliferation of Keratinocyte Cultures: Involvement of reactive Oxygen Species. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 22, n.4, p. 212-218, 1998.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R.; **Fisioterapia Dermato- Funcional**. 3ed. São Paulo: Manole, 2002. p.3- 32; 209-222, cap. 1, 8.

HALCIN, C.H.; UITTO, J. Biologic Effects of Low-Energy Lasers. In: ARNDT, K.A .; DOVER, J.S.; OLBRICHT, S.M. **Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery**. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1997, p. 303-328, cap. 15.

HALL, G.et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swedish Dental Journal**, v.18, p. 29-34, 1994.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Advances in Photodynamic Theory. **Optics & Photonics News**. v.7, n.7, p. 17-21, 1996.

HAMBLIN, M.R. et.al. Rapid Control of Wound Infections by Targeted photodynamic Therapy Monitored by *In Vivo* Bioluminescence Imaging. **Photochemistry and Photobiology**. v.75, n.1, p. 51-57, 2002.

HARRIS, D.M.; PICK, R. Laser Physics. In: MISERENDINO, L.J.; PICK, R.M. **Lasers in Dentistry**. Chicago: Quintessence books, 1995, p. 27-38, cap.2.

HENDERSON, A .R. **A Guide to Laser Safety**. London: Chapman & Hall, 1997, p. 63-76, 191-204, cap. 2, 9.

HERNANDEZ, M.I.M.; DELGADO, J.A .G. Lasers de baja potencia: resultados de su aplicación la rehabilitación. **Revista Cubana Ortopedia Traumatologia**, v.10, n.1,1996. Disponível em: [http://www.sld.cu/revistas/ort/vol10\\_1\\_96/ort14196.htm](http://www.sld.cu/revistas/ort/vol10_1_96/ort14196.htm). Acesso em: 10 ago. 2001.

HOMURA, A . et al. Analgesic Effects of Ga-Al-As Diodo Laser Irradiation on Hyperalgesia in Carrageenin-Induced Inflammation. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 13, n.4, p. 463-469, 1993.

HOUGHTON, P.E.; BROWN, J.L. Effect of Low Level Laser on Healing in Wounded fetal Mouse Limbs. **Laser Therapy**. v. 11, n.2, p. 54-70, 1999.

ITZKAN, I.; BOURGELAIS, D.B.C. An Introduction to Lasers. In: ARNDT, K.A .; DOVER, J.S.; OLBRICHT, S.M. **Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery**. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1997, p. 11-24, cap.2.

JAYASREE, R. S.; GRUPTA, A .K.; RATHINAM, K.; MOHANAN, P.V.; MOHANTY, M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **J. Biomater. Appl.** v.15, p. 176-186, 2001.

JAMIL, B. et al. Qualitative Difference in the Generation of Activated Oxygen Species by Photosensitizers Used in PDT. **Medical Laser Applications**, v.1, n.1, p. 49-54, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 303- 314, cap. 18

KANA, J. S. et al. Effect of Low- Power Density Laser Radiation on Healing of Open Skin Wounds in Rats. **Laser Radiation in Skin Wounds. Arch. Surgery**. v. 116, p. 293-296, 1981.

KARU, T. Photobiology of Low- Power Laser Effects. **Health Physics**. v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v.27, n.3, p. 219-223, 1995.

KARU, T. **The Science of Low- Power Laser Therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Science, 1998, 299p, cap. 4.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near- IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology: B. Biol.** v.49, n.1, p. 1-17, 1999.

KIM, K.S. et al. Application of low level laser therapy (LLLT) for the treatment of the infected wound. In: **CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR LASERS IN DENTISTRY, 5.** , 1996, Jerusalem, Israel, p.7-12.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 46- 58; 191- 210, cap. 3, 13.

KLUBER, A . et. Al. Effect of photodynamic therapy on the healing of a rat skin flap and its implication for head and neck reconstructive surgery. **Lasers Surg. Med.** v. 18, p. 397-405, 1996.

KREISLER, M. et al. Effect od Diode Laser Irradiation on the Survival Rate of Gingival Fibroblast Cell Cultures. **Lasers in Surgery and Medicine.** v.28, p. 445-450, 2001.

LAGAN, K.M. et al. Low-Intensity Laser Therapy / Combined Phototherapy in the Management of Chronic venous Ulceration: A Placebo-Controlled Study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.** v. 20, n.3, p. 109-116, 2002.

LICHTENSTEIN, D.; MORAG, B.; Low Level Laser Therapy in Ambulatory Patients with Venous Stasis Ulcers. **Laser Therapy.** v. 11, n.2, p. 71-78, 1999.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A .M. The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 26, n.1, p. 1-11, 1961.

LOW, J.; REED, A .**Eletroterapia Explicada- Princípios e Práticas**. 3ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 17- 31; 389- 409, cap. 1, 14.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LAVIE, R. Photobiostimulation as a Function of Different Wavelengths. **Laser Therapy**, v. 12, p. 38-41, 1999.

LYTLE, A .C. et al. Light emitting diode source for photodynamic therapy. In: **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: proceedings**. Bellingham: SPIE, 1993. v.1881, p.180-188.

MACHADO, A .E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p. 237-243, 2000. Disponível em : [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422000000200015&1ng=pt&nrm=isso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000200015&1ng=pt&nrm=isso). Acesso em : 19 jun. 2002.

McCAW, D.L. et. al. Treatment of canine hemangio-pericytomas with photodynamic therapy. **Lasers Surg. Med.** v. 29, p. 23-26, 2001.

MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**. v. 187, p. 493, 1960.

MALM, M.; LUNDEBERG, T. Effect of Low Power Gallium Arsenide Laser on Healing of Venous Ulcers. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 25, p. 249-251, 1991.

MELLO, J.B.; MELLO, G. P. S. **Laser em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2001. p. 3- 85, cap. 1 a 7.

MESTER, E.; MESTER, A . F.; MESTER, A . The Biomedical Effects of Laser Application. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 5, p. 31-39, 1985.

MINOSSI, J.G. et al. Efeito do Diclofenaco de Sódio na Cicatrização da Parede Abdominal de Ratos. Estudo Histopatológico, da Força de Ruptura e do Colágeno

Tecidual. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n.3, 2001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-865020010003000006&lng=en&nr=isso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-865020010003000006&lng=en&nr=isso). Acesso em: 7 abr. 2002.

MISERENDINO, L.J.; LEVY, G.; MISERENDINO, C. A . Laser Interaction with Biologic Tissue. In: MISERENDINO, L.J; PICK, R.M. **Lasers in Dentistry**. Chicago: Quintessence books, 1995, p. 39-55, cap.3.

MONETTA, L. **Análise Evolutiva do Processo de Cicatrização em Úlceras Diabéticas, de Pressão e Venosas com uso de Papaína**. 1998, 192f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo.

MORRONE, G. et al. Muscular Trauma Treated with a Ga-Al-As Diode Laser: In Vivo Experimental Study. **Lasers Medical Science**, v. 13, p. 293-298, 1998.

MOSLEY, H. How to determine an appropriate dose when using various light sources in photodynamic therapy. In: **Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and other Modalities II**. Bellingham: SPIE, 1996. v.2924, p. 286- 291.

NELSON, J.S.; McCULLOUGH, J.L.; BERNS, M.W. Principles and Applications of Photodynamic Therapy in Dermatology. In: ARNDT, K.A .; DOVER, J.S.; OLBRICHT, S.M. **Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery**. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997, p. 349-381, cap. 17.

NIEMZ, M. **Laser – Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. Berlin: Springer, 1996. p. 49-58, cap. 3.

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-Mediated Bactericidal Effect of He-Ne Laser Irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.12, p. 450-458, 1992.

PAREKH, S.G. et al. Photodynamic Modulation of Wound Healing with BPD – MA and CASP. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 24, n.5, p. 375-381, 1999.

PASSARELLA, S. et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Febs Letters**. v.175, n.1, p. 95-99, 1984.

PAZOS, M. C. “**Análise Ultraestrutural de Células Submetidas a tratamento com Fotossensibilizadores e Radiação Laser.**” 2001, 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba

PINHEIRO, A .L.B.; Evolução Histórica e Classificação dos Lasers. In: BRUGNERA JÚNIOR, A .; PINHEIRO, A .L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998, p. 19-26, cap. 1.

PINHEIRO, A .L.B. Interação Tecidual – Lasers Cirúrgicos. In: BRUGNERA JÚNIOR, A; PINHEIRO, A .L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p.47-62, cap. 3.

REDDY, G.K.; STENHO-BITTEL,L.; ENWEMEKA, C. Laser Photostimulation of Collagen Production in Healing Rabbit Achilles Tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 22, n.5, 281-287, 1998.

RIES, W.R.; SPEYER, M.T.; Cutaneous Applications of Lasers. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 29, n.6, p. 915-929, 1996.

RIGAU i MAS, J. **Acción de la Luz Láser a Baja Intensidad en la Modulación de la Función Celular**. 1996, 208f. Dissertação (Doutorado em Medicina). Universitat Rovira i Virgili.



RIGAU i MAS, J. Bioenergia e Propriedades Ópticas dos Tecidos. In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A .L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998, p. 63-78, cap.4.

ROCHKIND, S. et al. Stimulatory Effect of He-Ne Low Dose Laser on Injured Sciatic Nerves of Rats. **Neurosurgery**. v. 20, n. 6, p. 843- 847, 1987.

ROSENSHEIN, J.S. Laser Biostimulation: Photobioactivation, a Modulation of Biologic Processes by Low-Intensity Laser Radiation. In: CLAYMAN, L.; KUO, P. **Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry**. New York: Thieme, 1997, p. 137-142, 165-174, cap. 11, 15.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J.; **Histologia Texto e Atlas**. 2ed. São Paulo: Panamericana, 1993. cap.1, 3- 6, 14.

SCHLAGER, A . et al. Low-Power Laser Light in the Healing of Burns: A Comparison Between Two Different Wavelengths (635nm and 690nm) and a Placebo Group. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 27, n. 1, p. 39-42, 2000.

SIBATA, C.H. et al. Photodynamic Therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 869-880, 2000.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A .D.; DEPOLO, A . Wound Healing of Animal and Human Body Sport and Traffic Accident Injuries Using Low-Level Laser Therapy Treatment: A Randomized Clinical Study of Seventy- Four Patients with Control Group. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v. 18, n.2, p. 67-73, 2000.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, Aplicações e Avanços recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p. 801 - 807, 2002. Disponível e:

http: // [www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000500016&1ng=em&nrm=isso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500016&1ng=em&nrm=isso). Acesso em: 14 jan. 2003.

SMELTZER, S., C.; BARE, B. G.; **Tratado de Enfermagem Médico - Cirúrgica**. 8ed. v.1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 84-91, 358-367, cap. 8, 21.

STADLER, I. Et al. In Vitro Effects of Low- Level Laser Irradiation at 660nm on Peripheral Blood Lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 27, p. 255-261, 2000.

STEVENS, A .; LOWE, J. **Patologia**. 2ed. São Paulo: Manole, 1998. p.57- 74, cap. 5

STUART, L; DUGAN, M. Global Status of Clinical Photodynamic Therapy: The Registration Process for a New Therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.12, p. 318-324, 1992.

TATURANAS, A . C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo Clínico e Anatomopatológico da Cicatrização Cutânea no Gato Doméstico. Utilização do Laser de Baixa Potência GAAS (904 nm). **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n. 2, 1998. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86501998000200004&1ng=em&nrm=is](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000200004&1ng=em&nrm=is). Acesso em 21 mar. 2002.

TCHORNOBAY, A . M.; FILUS NETO, J. Anatomia e Fisiologia da Pele- Processo de Envelhecimento Cutâneo. In: BADIN, A .Z. D.; MORAES, L. M.; ROBERTS III, T. L. **Rejuvenescimento Facial a Laser**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, p. 85-113, cap.4.

VEÇOSO, M.C. **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993, 143p.

VERA MENDEZ, T. M. T. **Avaliação da influência da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas à laserterapia.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

VON KOSSEL, K. et al. Gangliosídeos – Estudo do Colágeno e da Resposta Inflamatória no Processo Cicatricial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, suppl.1, 2000. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502000000500005&lng=en&nr](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000500005&lng=en&nr). Acesso em: 12 maio 2002.

WALKER, M. et al. Effect of Low- Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation- Impaired Wound –Healing Model in Murine Skin. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 26, p. 41-47, 2000.

WIEMAN, T.J. et al. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. **Surgery** , v.104, n.3, p.512-517, 1988.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of Radiation Phenomena of Electrons and Therapeutic Low-Level Laser in Regard to the Mitochondrial energy Transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v. 16, n.3, p. 159-165, 1998.

YILMAZ, S. et al. Effects of Galium Arsenide Diodo Laser on Human Periodontal Disease: A Microbiological and Clinical Study. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 30, n. 1, p. 60- 66, 2002.

YU, W.; NAIM, J. O .; LANZAFAME, R.J. Effects of Photostimulation on Wound Healing in Diabetic Mice. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 20, n.1, p. 56-63, 1997.



## 8.1 Anexo I – Carta do Comitê de Ética



**Missão Salesiana de Mato Grosso - Complexo Salesiano**

Faculdade de Ciências Administrativas e Contábeis de Lins - Cursos de Administração e Ciências Contábeis  
 Faculdade de Educação Física de Lins - Cursos de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
 Colégio Salesiano "Dom Henrique Mourão" - Ensino Médio  
 Centro de Reabilitação Física Dom Bosco

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DAS FACULDADES SALESIANAS DE LINS**

**CERTIFICADO**

Certificamos, que o Protocolo n.º 018/2002/CEP, sobre "AVALIAÇÃO DO USO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DROGA FOTOSSENSIBILIZADORA NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO", sob a responsabilidade de Janine Cuzzolin e Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático- Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, aprovado por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Lins, 15 Julho de 2002



**PROF. EVANDRO EMANOEL SAURO**  
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdades Salesianas de Lins

Rua Dom Bosco, 265 - 16460-185 - Fone (14) 522-4733 - Fax (14) 522-3633 - e-mail: salesiano@salesianolins.br - CNPJ 03.226.149/0024-78

