

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

DORA PATRICIA RAMIREZ ANGARITA

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA PELE DE RATO WISTAR APÓS
MÚLTIPLAS SESSÕES DE TERAPIA FOTODINÂMICA**

São Carlos

2012

DORA PATRICIA RAMÍREZ ANGARITA

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA PELE DE RATO WISTAR APÓS
MÚLTIPLAS SESSÕES DE TERAPIA FOTODINÂMICA**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de São Carlos, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre(a) em Biotecnologia.**

Orientadores: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Prof.^a Dr.^a Cristina Kurachi

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R173ac Ramírez Angarita, Dora Patricia.
Avaliação da cicatrização da pele de rato wistar após
múltiplas sessões de terapia fotodinâmica / Dora Patricia
Ramírez Angarita. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
94 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Cicatrização
de feridas. 4. Microscopia confocal. 5. Geração do segundo
harmônico. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Dora Patricia Ramirez Angarita

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 25/10/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Cristina Kurachi (Orientadora)
(PPG-Biotec/UFSCar)



Prof^ª. Dr^ª. Ana Gabriela Salvio (Hospital Amaral Carvalho/Jau)



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (DMP/UFSCar)

Dedico este trabalho a Deus principalmente, minha família e a meu esposo que me dão força e sabedoria; A força para enfrentar qualquer dificuldade e a sabedoria para fazer o que é correto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, em primeiro lugar, pelas graças e oportunidades que me foram dadas na vida.

À meus pais pelo apoio incondicional. À minha mãe agradeço os valores, os objetivos de vida que me transmitiram e o amor "*muchas gracias*". A meu querido irmãozinho e minha amada sobrinha porque são minha inspiração e fazem que cada dia eu queira me esforçar mais.

Um agradecimento muito especial para Camilo, meu marido, por todo o tempo que não lhe pude dedicar, em prol da realização deste trabalho, pelas palavras de incentivo e, essencialmente, por me ter feito acreditar que era capaz.

À minha segunda família especialmente as senhoras Maria Antonia e Rosa por sua confiança e apoio brindado em momentos cruciais.

Ao professor Vanderlei e a Professora Cristina pela orientação, dedicação e amizade. Agradeço pela paciência, apoio permanente, pelo conhecimento e experiências compartilhadas sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao professor Tirapelli a Sandra e o senhor Til, pelo apoio e vontade de ajudar sempre.

À Natalia e Lilian por todo o apoio pessoal, carinho e por estar sempre prestes a escutar e ajudar oferecendo seus conhecimentos.

Ao Alexandro, Didi e Clovis por sua amizade, contribuições e apoio brindado na reta final deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Paulinha, Hilde, Layla, Cintia, Fernanda, Dilleys, Miriam, Larissa, Sebastião, e demais pelo apoio e contribuições.

Aos amigos Colombianos Sandra, Aymer e o pequeno Abraham por suas dicas valiosas e longas conversas da vida.

À minha eterna amiga Paty, por suas preces e amizade, mesmo longe.

À Yazmín e Victor por sua preocupação, preces e amizade.

Aos funcionários e amigos do IFSC em especial a Isabel, Benê e Cristiane pelo apoio constante.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFscar e o IFSC/USP pela oportunidade oferecida.

Ao CAPES pela bolsa concedida.

Ao Brasil, gigante da América do Sul, pela imensurável contribuição em minha formação e pela oportunidade de realizar esta aspiração pessoal. Minha eterna gratidão.

RESUMO

O Câncer de pele não melanoma é o câncer mais frequente da população mundial, se tornando um problema de saúde pública. Devido a essa problemática, novas tecnologias estão sendo testadas para o tratamento desta doença. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica não invasiva com excelentes resultados estéticos, bem tolerada pelos pacientes e com bons resultados de cura quanto usado para lesões iniciais. Usa o oxigênio molecular, a luz num comprimento de onda adequado e o medicamento fotossensibilizador para formar espécies altamente reativas como o oxigênio singlete responsável pela fotoinativação das células alvo. As características do tecido cicatrizado após múltiplas sessões de TFD não são completamente conhecidas. Ainda não se tem conhecimento se múltiplas sessões de TFD podem ocasionar modificações irreversíveis no tecido tratado. Desta forma, o presente estudo tem como principal objetivo a avaliação das características da pele cicatrizada após múltiplas sessões de TFD. Para este estudo, aprovado pelo comitê de ética e pesquisa foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem Wistar, divididos em 5 grupos com 5 animais por cada grupo: G0 controle, não foi submetido a nenhum procedimento; G1, submetidos a uma sessão de TFD na pele do dorso, posteriormente, nesta pele cicatrizada foi feita uma lesão externa com laser de CO₂; G2, o grupo passa duas vezes pelo mesmo procedimento explicado anteriormente; G3, o grupo passa três vezes pelo procedimento e para o grupo G4 é repetido os procedimentos em quatro ocasiões. Após a cicatrização dos procedimentos é feita uma avaliação macroscópica, um análise microscópica e uma avaliação da microestrutura das fibras de colágeno e geração do segundo harmônico por microscopia multi-fótons. Macroscopicamente, foi observada uma cicatrização satisfatória para os diferentes grupos tratados se apresentando uma diminuição no resultado estético após a terceira e a quarta sessão. No estudo microscópio, foi evidente uma conservação da quantidade de glândulas sebáceas por mm². A morfologia das fibras de colágeno apresentaram modificações que foram mais acentuadas na terceira e quarta sessão, se evidenciando fibras de menor espessura, com uma disposição paralela e menor densidade quando comparadas ao grupo

controle. Não foi evidente diminuição da geração do secundo harmônico nas lâminas estudadas.

A partir destes dados sugere-se que a cicatrização na pele após 4 sessões de TFD/lesão, apresenta modificações no resultado estético, histológico, da morfologia das fibras de colágeno que podem estar relacionadas com acometimento consecutivo da pele em 8 ocasiões com uma cicatrização incompleta entre elas.

Palavras-Chaves: Terapia Fotodinâmica, múltiplas sessões, cicatrização, microscopia confocal, geração do segundo harmônico

ABSTRAC

Nonmelanoma skin cancer is the most frequent disease in the world population and it is becoming a public health problem. Due to this fact, new technologies are being tested for the treatment of this disease. Photodynamic Therapy (PDT) is a noninvasive technique with an excellent cosmetic outcome, well tolerated by patients and with good healing results when used for the initial stages of cancer lesions. PDT uses molecular oxygen, light at appropriate wavelengths and the drug photosensitizers to generation of reactive oxygen species such as singlet oxygen responsible for the photoinactivation of target cells. The characteristics of scar tissue after multiple sessions of PDT is not completely understood. It is not known whether multiple sessions of PDT may cause irreversible changes in the treated tissue. Thus, the present study has as its main objective the evaluation of the characteristics of the skin scarred after multiple sessions of PDT. For this study, we used 25 Wistar type male mice. These 25 mice were grouped into 5 subgroups of 5 each: G0, control group, non-subjected to any treatment; G1, exposed to one PDT session and after, there was made a lesion with CO₂ laser over the scarred tissue; G2, the group is submitted twice for the same procedure, G3, subjected to 3 times the procedure performed for G1 group; G4, exposed to 4 times the procedure. Once the mice's skin was healed, we performed macroscopic and microscopic evaluations of the histological pieces. Furthermore, we made a microscopic evaluation of collagen fibers and the generation of the second-harmonic through multiphotons microscopy. Macroscopically, it was observed a good healing for the different groups. The aesthetic result showed a decrease after the third and fourth sessions. In the microscopic study, it was observed an conservation of the quantity of sebaceous glands per square millimeter (mm²). The morphology of collagen fibers when evaluated using two-photon excited fluorescence in the confocal microscope, showed thinner fibers with a parallel arrangement and lower density in the G3 e G4 compared to the control group. It was not observed decrease in the generation of second harmonic in histopathology slides. These results suggest that healing in skin after four (4) sessions of PDT/lesion presents alterations in aesthetic and histological of

the morphology of collagen fibers that may be related to submitted of the skin in eight (8) consecutive occasions with an incomplete healing between them.

Key words: Photodynamic Therapy, multiple sessions, wound healing, confocal microscopy, second harmonic generation.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** METABOLISMO DO GRUPO HEME. O ALA É SINTETIZADO A PARTIR DA GLICINA E SUCCINIL-CoA. APÓS SER METABOLIZADO POR DIFERENTES ENZIMAS É CONVERTIDO EM PROTOPORFIRINA IX. ADAPTADO (TOREZAN; NIWA E NETO, 2009).... 6
- FIGURA 2:(A)** ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5- AMINOLEVULÍNICO; **(B)** ESTRUTURA QUÍMICA DA PROTOPORFIRINA IX..... 7
- FIGURA 3: (A)** ESPETRO DE ABSORÇÃO DO PHOTOFRIN®, APRESENTANDO 5 BANDAS DE ABSORÇÃO, ADAPTADO (WILSON; PATTERSON, 2008). **(B)** PROPAGAÇÃO DA LUZ DENTRO DO TECIDO, ADAPTADO (AGOSTINIS ET AL., 2011). 7
- FIGURA 4:** DIAGRAMA DE JABLONSKI MODIFICADO. O FS APÓS ABSORVER UM FÓTON PASSA DO ESTADO FUNDAMENTAL AO ESTADO EXCITADO PODENDO PARTICIPAR DE DOIS TIPOS DE REAÇÕES. NA REAÇÃO TIPO I O FS EM SEU ESTADO EXCITADO PARTICIPA EM REAÇÕES DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS GERANDO RADICAIS OU ÍONS RADICAIS. NA REAÇÃO TIPO II É FORMADO OXIGÊNIO SINGLETTO (1O_2) ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE O FS EXCITADO E O OXIGÊNIO MOLECULAR (3O_2). 8
- FIGURA 5:** PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS A LESÃO. HÁ EXTRAVASAMENTO DE HEMÁCIAS E PLAQUETAS, ESTAS ÚLTIMAS ENCARREGADAS DA FORMAÇÃO DO TAMPÃO HEMOSTÁTICO. ADAPTADO DE DIEGELMANN, EVANS(2004). 11
- FIGURA 6:** PROCESSO INFLAMATÓRIO. MIGRAÇÃO DE PLAQUETAS E CÉLULAS IMUNOLÓGICAS (NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS) AO LOCAL DA LESÃO. ADAPTADO DE DIEGELMANN, EVANS.(2004). 11
- FIGURA 7:** PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO. OCORRE MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS (RE-EPITELIZAÇÃO). ADAPTADO DE DIEGELMANN, EVANS (2004). 14
- FIGURA 8:** PROCESSO DE REMODELAGEM. OCORRE UMA REORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO SENDO SUBSTITUÍDO O TIPO I PELO III. ADAPTADO DE DIEGELMANN, EVANS (2004). 15
- FIGURA 9:** ILUMINAÇÃO DA PELE DO RATO COM O LASER. OBSERVE-SE A MÁSCARA DE PROTEÇÃO SOBRE A PELE PARA EVITAR A ILUMINAÇÃO DE REGIÕES ALÉM DA ÁREA DE INTERESSE. 24
- FIGURA 10:** LASER DE CO₂..... 25
- FIGURA 11:** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS UTILIZADOS NA PESQUISA. G0, GRUPO CONTROLE, NÃO RECEBEU NENHUM TRATAMENTO; G1, GRUPO SUBMETIDO A UMA SESSÃO; G2, SUBMETIDO A DUAS SESSÕES; G3, SUBMETIDO A TRÊS SESSÕES; G4, SUBMETIDO A 4 SESSÕES CONSECUTIVAS. 26
- FIGURA 12:** RATO COM PELE COBERTA COM PAPEL ALUMÍNIO PARA EVITAR A FOTOSSESIBILIZAÇÃO DA MEDICAÇÃO. 27
- FIGURA 13:** LESÃO FEITA COM LASER DE CO₂. 28
- FIGURA 14:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DIFERENTES SESSÕES A QUE FORAM SUBMETIDOS OS ANIMAIS DE CADA GRUPO. (G0) GRUPO QUE NÃO FOI SUBMETIDO A NENHUM PROCEDIMENTO. (G1) GRUPO SUBMETIDO A UMA SESSÃO DE TFD, POSTERIORMENTE, NA PELE CICATRIZADA FOI FEITA UMA LESÃO EXTERNA COM LASER DE CO₂. (G2) O GRUPO PASSA DUAS VEZES PELO MESMO PROCEDIMENTO EXPLICADO ANTERIORMENTE. (G3) O GRUPO PASSA TRÊS VEZES PELO PROCEDIMENTO. (G4) O GRUPO PASSA PELO PROCEDIMENTO EM QUATRO OCASIÕES. 29
- FIGURA 15:** FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO UMA UNIDADE PILOSSEBÁCEA COMPOSTA PELO FOLÍCULO PILOSO E A GLÂNDULA SEBÁCEA. (*)FOLÍCULO PILOSO. VERHOEFF 50X..... 31
- FIGURA 16:** FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO AS CAMADAS DO TEGUMENTO E A DEMARCAÇÃO DE UM CAMPO PARA A CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE FIBROBLASTOS NAS CAMADAS PAPILAR (P) E RETICULAR (R) DA DERME. EPIDERME (*); HIPODERME COM CÉLULAS ADIPOSAS (A); CAMADA MUSCULAR (M). TRICRÔMICO DE MASSON; 50X. 32

FIGURA 17: FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO A MARCAÇÃO (CRUZ EM VERMELHO) DOS NÚCLEOS DO NÚMERO TOTAL DE FIBROBLASTOS NA CAMADA RETICULAR DA DERME DE UM DOS CAMPOS DE UM ANIMAL DO GRUPO G2. TRICRÔMICO DE MASSON; 400x.....	32
FIGURA 18: FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO OS LUGARES ESCOLHIDOS NA LÂMINA HISTOLÓGICA PARA ESTUDO MORFOMÉTRICO DO COLÁGENO E SHG. HE; 400x.....	34
FIGURA 19: PELE CICATRIZADA APÓS A PRIMEIRA SESSÃO.....	39
FIGURA 20: PELE CICATRIZADA APÓS A SEGUNDA SESSÃO.....	42
FIGURA 21: PELE CICATRIZADA APÓS A TERCEIRA SESSÃO.....	44
FIGURA 22: PELE CICATRIZADA APÓS A QUARTA SESSÃO.....	48
FIGURA 23: GRÁFICO QUE REPRESENTA OS DIFERENTES TEMPOS DE CICATRIZAÇÃO. (*) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTRAGRUPO (TFD VS LESÃO), $P < 0,05$; (°) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO (TFD: G1xG2, G1xG3, G1xG4), $P < 0,05$; (®) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO (TFD: G2xG3, G2xG4), $P < 0,05$; (°) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO (LESÃO: G1xG2), $P < 0,05$; (°) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO (LESÃO: G2xG3, G2xG4), $P < 0,05$	50
FIGURA 24: REPRESENTAÇÃO ICONOGRÁFICA DO RESULTADO FINAL DA PELE TRATADA COM TFD E SUBMETIDA À LESÃO. COMPARAÇÃO DO RESULTADO MACROSCÓPICO DOS GRUPOS G1, G2, G3, G4.....	51
FIGURA 25: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DA CONCENTRAÇÃO DE GLÂNDULAS/MM ² . NÃO APRESENTOU DIFERENÇA ESTATÍSTICA INTERGRUPO.....	53
FIGURA 26: FOTOMICROGRAFIAS DEMONSTRANDO A DERME E EPIDERME, CAMADAS DO TEGUMENTO E AS UNIDADES PILOSSEBÁCEAS, COMPOSTAS DO FOLÍCULO PILOSO E DA GLÂNDULA SEBÁCEA: EPIDERME (*); DERME (D); HIPODERME COM CÉLULAS ADIPOSAS (A). NOTE-SE A DIMINUIÇÃO DE GLÂNDULAS SEBÁCEAS, ASSOCIADA À FIBROSE DO TECIDO. [VERHOFF; 50x].....	54
FIGURA 27: REPRESENTAÇÃO DA QUANTIDADE DE FIBROBLASTOS ENCONTRADA NA DERME; AS BARRAS PRETAS REPRESENTAM O GRUPO CONTROLE. (*) DIFERENÇA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO- CAMADA PAPILAR (G4 VS G0, G1, G2, G3), $P < 0,05$	56
FIGURA 28: DERME RETICULAR. FOTOMICROGRAFIAS DA FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x).....	57
FIGURA 29: DERME PAPILAR. FOTOMICROGRAFIAS DA FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x).....	58
FIGURA 30: DERME RETICULAR. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO (COR AZUL) E FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x).....	60
FIGURA 31: DERME PAPILAR. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO (COR AZUL) E FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x).....	61
FIGURA 32: LOCALIZAÇÃO DAS DIFERENTES DOSES IRRADIADAS NA PELE DO RATO WISTAR.....	77
FIGURA 33: PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO AVALIADO EM DIFERENTES DIAS, APÓS DIFERENTES DOSES DE TFD. (A) 100 J/cm ² , (B) 50 J/cm ² , (C) 30 J/cm ² , (D) 10 J/cm ²	78
FIGURA 34: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO.....	82
FIGURA 35: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DIFERENTES SESSÕES A QUE FORAM SUBMETIDOS OS ANIMAIS DE CADA GRUPO. (L1) GRUPO SUBMETIDO A UMA LESÃO COM LASER DE CO ₂ . (L2) O GRUPO PASSA DUAS VEZES PELO MESMO PROCEDIMENTO EXPLICADO ANTERIORMENTE. (L3) O GRUPO PASSA TRÊS VEZES PELO PROCEDIMENTO. (L4) O GRUPO PASSA PELO PROCEDIMENTO EM QUATRO OCASIÕES.....	83

FIGURA 36: PELE CICATRIZADA DOS DIFERENTES ANIMAIS QUE FORAM SUBMETIDOS A UMA OU VARIAS LESÕES CONSECUTIVAS, SEM TFD (ANIMAIS L1, L2, L3 E L4).....	84
FIGURA 37: FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO A DERME E EPIDERME, CAMADAS DA PELE E AS UNIDADES PILOSEBÁCEAS, COMPOSTAS DO FOLÍCULO PILOSO E DA GLÂNDULA SEBÁCEA: EPIDERME (*);DERME (D); HIPODERME COM CÉLULAS ADIPOSAS (A); ATROFIA (SETAS). NOTA-SE A AUSÊNCIA DE GLÂNDULAS SEBÁCEAS E FOLÍCULOS PILOSOS NOS ANIMAIS L3 E L4. [VERHOFF; 50X].....	87
FIGURA 38: DERME RETICULAR GRUPOS LESÃO. OBSERVA-SE A ESPESSURA, DENSIDADE Y DISPOCISÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO. FOTOMICROGRAFIAS DA FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x). O.....	88
FIGURA 39: DERME PAPILAR. OBSERVA-SE A ESPESSURA, DENSIDADE Y DISPOCISÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO. FOTOMICROGRAFIAS DA FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÁGENO CORADAS COM HE (400x).....	88
FIGURA 40: DERME RETICULAR. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA GERAÇÃO DO SEGUNDO HARMÔNICO (COR AZUL) E FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÂGENO CORADAS COM HE (400x)	90
FIGURA 41: DERME PAPILAR. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA GERAÇÃO DO SEGUNDO HARMÔNICO (COR AZUL) E FLUORESCÊNCIA DAS FIBRAS DE COLÂGENO CORADAS COM HE (400x)	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TEMPO DE CICATRIZAÇÃO(DIAS) DA PELE DE CADA RATO SUBMETIDA A UMA PRIMEIRA SESSÃO NO GRUPO G1.	38
TABELA 2: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA PELE DOS RATOS DO GRUPO G1 NO FIM DA 1ª SESSÃO. (0): AUSÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS; (1+) ATÉ (4+): GRAUS DA APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS.	38
TABELA 3: TEMPO DE CICATRIZAÇÃO (DIAS) DA PELE DE RATO SUBMETIDA A DUAS SESSÕES.	40
TABELA 4: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA PELE DOS RATOS DO GRUPO G2 NO FIM DA 2ª SESSÃO.(0): AUSÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS; (1+) ATÉ (4+): GRAUS DA APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS.	41
TABELA 5: TEMPO DE CICATRIZAÇÃO (DIAS) DA PELE DE RATO SUBMETIDA A TRÊS SESSÕES.	44
TABELA 6: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA PELE DOS RATOS DO GRUPO G3 AO FINAL DA 3ª SESSÃO. (0): AUSÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS; (1+) ATÉ (4+): GRAUS DA APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS	45
TABELA 7: TEMPO DE CICATRIZAÇÃO (DIAS) DA PELE DE RATO SUBMETIDA A QUATRO SESSÕES.	46
TABELA 8: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA PELE DOS RATOS DO GRUPO G4 AO FINAL DA 4ª SESSÃO.(0): AUSÊNCIA DE CARACTERÍSTICAS; (1+) ATÉ (4+): GRAUS DA APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS	47
TABELA 9: VALORES DE MÉDIA, DESVIO PADRÃO E RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO DA TFD E A LESÃO NOS DIFERENTES GRUPOS.	49
TABELA 10: VALORES DE MÉDIA, DESVIO PADRÃO E RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA QUANTIDADE DE GLÂNDULAS/MM ² . NÃO APRESENTA SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA INTERGRUPO.	53
TABELA 11: VALORES DA MÉDIA, DESVIO PADRÃO E RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA QUANTIDADE DE FIBROBLASTOS EM CADA CAMADA.	55
TABELA 12: DOSES DE ENERGIA ENTREGUES NA SUPERFÍCIE DA PELE DO RATO. EXPERIMENTO PILOTO.	77
TABELA 13: TEMPO DE CICATRIZAÇÃO(DIAS) DA PELE DE RATOS SUBMETIDA A UMA E VARIAS SESSÕES DE TFD.....	85
TABELA 14: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA PELE DOS RATOS SUBMETIDOS Á UMA OU VARIAS LESÕES POR LASER DE CO ₂	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA: Ácido 5 aminolevulínico

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria

CBC: Câncer basocelular

Coa: Coenzima A

EGF: Fator de crescimento endotelial

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FDA: *Food and Drug Administration* / EUA

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FS: Fotossensibilizador

HpD: Derivado de Hematoporfirina

IL1: Interleucina 1

KGF: Fator de crescimento de queratinócito

LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED: Light Emitting Diode

MAL: Aminunolevulinato de metila

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteases

PBG: Porfobilinogênio

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas

PpIX: Protoporfirina IX

QA: Queratose actínica

RNA-m: ácido ribonucléico mensageiro

SHG: Second Harmonic Generation

TFD: Terapia Fotodinâmica

TGF- α : Fator transformador de crescimento α

TGF- β : Fator transformador de crescimento β

TIMP: Inibidores de metaloproteases

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

USP: Universidade de São Paulo

FGF: fator de crescimento dos fibroblastos

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BREVE HISTÓRICO.....	3
1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	5
1.3 MECANISMO DE MORTE CELULAR	9
1.4 CICATRIZAÇÃO.....	10
1.4.1 <i>Inflamação</i>	10
1.4.2 <i>Proliferação</i>	12
1.4.3 <i>Remodelagem</i>	14
1.5 TERAPIA FOTODINÂMICA E CICATRIZAÇÃO.....	15
1.6 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	17
2. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
3. OS OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 MATERIAIS.....	23
4.1.1 <i>Animais</i>	23
4.1.2 <i>Fotossensibilizador</i>	23
4.1.3 <i>Fonte de luz</i>	24
4.1.4 <i>Laser de CO₂</i>	24
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 <i>Terapia Fotodinâmica</i>	25
4.2.2 <i>Lesão da pele feita com laser de CO₂</i>	27
4.2.3 <i>Eutanásia, remoção e preparo do material</i>	28
4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	29
4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA	30

4.4.1	<i>Verhoeff</i>	30
4.4.2	<i>Tricômio de Mason</i>	31
4.4.3	<i>Fluorescência do colágeno corado pela técnica da Hematoxilina-Eosina</i>	33
4.5	ANALISE ESTATÍSTICA	34
5.	RESULTADOSE DISCUSSÃO	37
5.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA PELE DOS RATOS SUBMETIDOS A VÁRIAS SESSÕES	37
5.1.1	<i>G1 (Uma sessão)</i>	37
5.1.2	<i>G2 (Duas sessões)</i>	39
5.1.3	<i>G3 (Três sessões)</i>	42
5.1.4	<i>G4 (Quatro sessões)</i>	45
5.2	ESTUDO MICROSCÓPICO	52
5.2.1	<i>Glândulas sebáceas</i>	52
5.2.2	<i>Fibroblastos nas camadas dérmicas</i>	55
5.2.3	<i>Estudo qualitativo da fluorescência do colágeno</i>	56
5.2.4	<i>Geração do segundo harmônico (SHG)</i>	58
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE I	74
	APÊNDICE II	80
	ANEXO I	92

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele não melanoma é um problema de saúde mundial, com aproximadamente 2 milhões de novos casos por ano, reportados nos Estados Unidos, sendo este tipo de câncer de pele, que abrange, câncer basocelular e espinocelular o tipo de câncer de maior incidência no Brasil, com 134.170 novos casos (Ministerio de Saúde, Instituto nacional de Câncer, 2012). Adotar novas técnicas para seu diagnóstico e tratamento precoce é de grande relevância para a saúde pública.

A Terapia Fotodinâmica (TFD ou PDT, do inglês *PhotodynamicTherapy*) é uma modalidade terapêutica empregada no tratamento de diferentes doenças. É usada amplamente para tratamento oncológico embora, outros usos como controle microbiológico em boca, tratamento de infecções parasitárias, fúngicas, bacterianas e de alguns vírus como o Herpes Simplex Virus têm sido reportados (BAGNATO, 2008). Na dermatologia, especificamente, é amplamente usada para tratamento de carcinomas de pele (LEHMANN, 2007), lesões potencialmente malignizáveis (AGOSTINIS et al., 2011), controle de doenças hiper-proliferativas, como a psoríase, e de outras condições não-oncológicas. Recentemente, a TFD também tem sido usada para fins estéticos como no rejuvenescimento (KOHL; KARRER, 2011).

Três elementos são fundamentais na TFD: a presença do fotossensibilizador (FS), a molécula que absorve luz para desencadear uma série de reações fotoquímicas; a luz em um comprimento de onda específico, e o oxigênio presente no tecido a ser tratado. O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um pró-fármaco e FS para TFD de segunda geração, que é convertido em Ptoporfirina IX (Pp IX), o FS endógeno formado para a reação. O ALA é frequentemente usado para indicações dermatológicas. Embora, possa ser administrado por via sistêmica, o uso pela via tópica é mais comumente utilizado devido a sua ação localizada e de baixa ou inexistente fotossensibilidade pós-tratamento. A TFD contribui para a destruição vascular com posterior déficit de oxigênio e nutrientes para as células tumorais (TFD

sistêmica), e causa dano direto na célula produzindo a morte por necrose ou apoptose.

A resposta do tecido à TFD é um processo inflamatório seguido de todas as etapas da cicatrização. Após ocorrido o dano fotoquímico induzido, inicia-se a etapa da inflamação, com alteração da microvascularização local, extravasamento de fatores do sangue, e saída de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e outros elementos como as plaquetas. Depois de aproximadamente 3 dias, inicia-se a fase proliferativa com a formação de novos vasos, ativação dos fibroblastos e síntese de matriz extracelular composta primordialmente por colágeno e elastina. Além disso, a re-epitalização começa com a multiplicação e migração de células, no caso da pele, de queratinócitos sobre a ferida, ocorrendo o fechamento da ferida. O processo final da cicatrização em condições normais é a remodelação que tem início durante a terceira semana, aproximadamente, onde ocorre uma maturação e remodelagem das fibras de colágeno (GURTNER et al., 2008).

Vários estudos apresentam efeitos positivos da TFD na cicatrização (GARCIA et al., 2010; LIAPINA et al., 2010; SILVA et al., 2004). Em geral tem-se encontrado diminuição do tempo total da cicatrização (JAYASREE et al., 2001) como resultado da diminuição no tempo da etapa da inflamação, formação de tecido de granulação precoce, e aceleração da re-epitelização (GARCIA et al., 2010). Para tratamento oncológico é possível usar a TFD em uma ou várias sessões, ainda que, o mais usual sejam os protocolos que usam duas ou uma única sessão para o tratamento, apresentando bons resultados de cura e excelente resultado estético quando comparadas com outras técnicas (BASSET-SEGUIN et al., 2008; SZEIMIES et al., 2008). Trabalhos avaliando a resposta da cicatrização na pele após várias sessões com TFD são escassos. As características do tecido cicatrizado após múltiplas sessões de TFD não são completamente conhecidas. Ainda não se tem conhecimento se múltiplas sessões de TFD podem ocasionar modificações irreversíveis no tecido tratado. Desta forma, o presente estudo tem como principal objetivo a avaliação das características da pele cicatrizada após múltiplas sessões de TFD.

1.1 Breve histórico

Há mais de mil anos a luz tem sido usada por chineses, egípcios e índios para tratamento de algumas doenças (ACKROYD et al., 2001). No início do século XX na Universidade Ludwig-Maximilian em Munique, Alemanha, Oscar Raab, um estudante de medicina orientado pelo Professor Hereon Hermann Von Tappeiner, observou os efeitos decorrentes da fotossensibilização em paramécio, confirmando que a associação entre luz e medicamento induz a morte do micro-organismo (BABILAS et al., 2005).

Os primeiros relatos com uso sistêmico de fotossensibilizador (FS) em humanos foi em 1900 por Prime, um neurologista francês que usou a eosina via oral para tratamento da epilepsia, observando como reação adversa, a dermatite em pele exposta ao sol depois do procedimento. Essa descoberta levou as primeiras tentativas de uso do fotossensibilizador com a luz para tratamento de câncer de pele.

Posteriormente, Jodlbauer Von Tappeiner et al., em 1904 demonstraram a necessidade do oxigênio nas reações de sensibilização, e propuseram as primeiras descrições do fenômeno chamado de “ação fotodinâmica” (ACKROYD et al., 2001). A partir daí, vários trabalhos foram realizados avaliando efeitos da fotossensibilidade e fototoxicidade, farmacodinâmica e farmacocinética dos FSs (DANIELL; HILL, 1991; MOAN; PENG, 2003). Em 1924, é relatada por meio da luz de Wood a fluorescência vermelha da Protoporfirina IX (PpIX) e em 1942 foi evidenciada a seletividade da retenção da PpIX no tumor, (ACKROYD et al., 2001).

Na década dos anos 60, Lipson relatou um caso bem sucedido de resposta em câncer de mama empregando derivados de hematoporfirina (HpD) e irradiação da lesão com luz visível (DOUGHERTY et al., 1998; LIPSON; BALDES e GRAY, 1967).

O primeiro estudo clínico com HpD foi realizado por Thomas Dougherty em 1978, onde 25 pacientes e 113 lesões malignas de pele foram tratadas, obtendo

resposta completa em 87% das lesões tratadas e resposta parcial no restante (DOUGHERTY et al., 1978). Nas décadas de 1970 e 80 outros estudos clínicos foram realizados para tratamentos de tumores no aparelho genital feminino, em cabeça e pescoço, estômago, esôfago, bexiga e pulmão (ALLISON; MOTA e SIBATA, 2004).

A grande desvantagem do uso de FSs de administração intravenosa é a prolongada fotossensibilidade à luz solar, fato que incentivou o desenvolvimento de novos fármacos de uso tópico com especial interesse na dermatologia.

Em 1990, Kennedy e colaboradores introduziram o uso do ALA na TFD, medicamento precursor de um FS endógeno e de aplicação tópica, que estimulou a aplicação de TFD em diferentes áreas da dermatologia e da estética (KENNEDY; POTTIER e PROSS, 1990). Em 1993, a *Canadian Health Protection Branch* anunciou a primeira aprovação do Photofrin® para o tratamento de câncer de bexiga. Seguidas aprovações foram feitas pela FDA (*Food and Drug Administration / EUA*) para o tratamento da queratose actínica (QA) usando ALA (2000) (ALLISON; MOTA e SIBATA, 2004). Na Europa, a aprovação foi com o uso de Metilaminolevulinato (MAL) para o tratamento do câncer Basocelular (CBC) e das lesões de pele premalignas (BABILAS et al., 2005). Em 2002, o grupo Britânico de *Photodermatology* publicou as diretrizes para uso oncológico da TFD e foram atualizadas no 2008 (MORTON; MCKENNA e RHODES, 2008), globalizando o conhecimento e uso da TFD.

No Brasil uma das primeiras experiências clínicas começou em 1998 com uma colaboração entre o Instituto de Física de São Carlos-USP, o hospital Amaral Carvalho e o Hospital Geral de Buffalo-EUA de T. Mang e R. Allison. Outra colaboração internacional estabelecida pelo IFSC foi com a Rússia (BAGNATO, 2005). Atualmente, diversos grupos no Brasil e no mundo continuam trabalhando e ampliando o conhecimento nesta área.

1.2 Mecanismos de ação da Terapia Fotodinâmica.

A TFD é uma fotoquimioterapia que tem a vantagem de ter uma ação localizada e seletiva nas células alvo. Três elementos básicos são necessários para a TFD, a luz em comprimento de onda adequado, o FS e o oxigênio presente nas células.

Diferentes tipos de fontes de luz são utilizados. Inicialmente foram utilizadas as lâmpadas, que têm uma emissão de amplo espectro, abrangendo quase toda a região de luz visível e do infravermelho próximo, podendo ser usada para diferentes tipos de FSs, quando filtros para seleção da região espectral são empregados. As lâmpadas são de menor custo e possuem altas irradiâncias, mas requerem condições especiais para sua utilização tanto em relação a sua manutenção quanto para operação. O LASER (do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) apresenta algumas vantagens com relação às lâmpadas, como a possibilidade de acoplamento em fibras ópticas para tratamento de órgãos internos, e emissão de uma luz colimada, mas esse sistema apresenta uma vida útil finita e a reposição da fonte tem custo elevado (BAGNATO, 2008). Com o desenvolvimento dos LEDs (do inglês *Light Emitting Diodes* ou Diodos Emissores de Luz), estes se tornaram uma excelente alternativa como fonte de luz para TFD. São fontes de iluminação que produzem luz não coerente, comprimento de onda não monocromático, sua operação é mais simples e a vida útil é superior quando comparada ao laser.

Um FS ideal para ser usado em TFD deve oferecer propriedades como baixa toxicidade no escuro, apresentar seletividade pela célula alvo, ter a possibilidade de ser eliminado do corpo num tempo curto após iluminada a lesão e ser ativado num comprimento de onda que penetre no tecido alvo. Os HpD são substâncias fotossensibilizantes de primeira geração, de uso sistêmico e que causam fotossensibilidade prolongada, efeito pouco atraente para uso em dermatologia. Devido a esse fato foram desenvolvidos FS de segunda geração que minimizam este efeito como o ácido 5 Aminolevulínico (ALA). O ALA é um pró-fármaco que é convertido enzimaticamente em PpIX *in situ* pelo ciclo bioquímico do grupo heme

(Figura 1) (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI e SALA, 2007a). Na Figura 2 é apresentada a estrutura química do ALA e da PpIX. O ALA é uma molécula hidrofílica e de baixo peso molecular, captada pelas células, principalmente através de transporte ativo, como Na⁺/Cl⁻ dependente de beta aminoácidos como glicina e ácido gama aminobutírico (GABA), que atuam como carregadores (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI e SALA, 2007a).

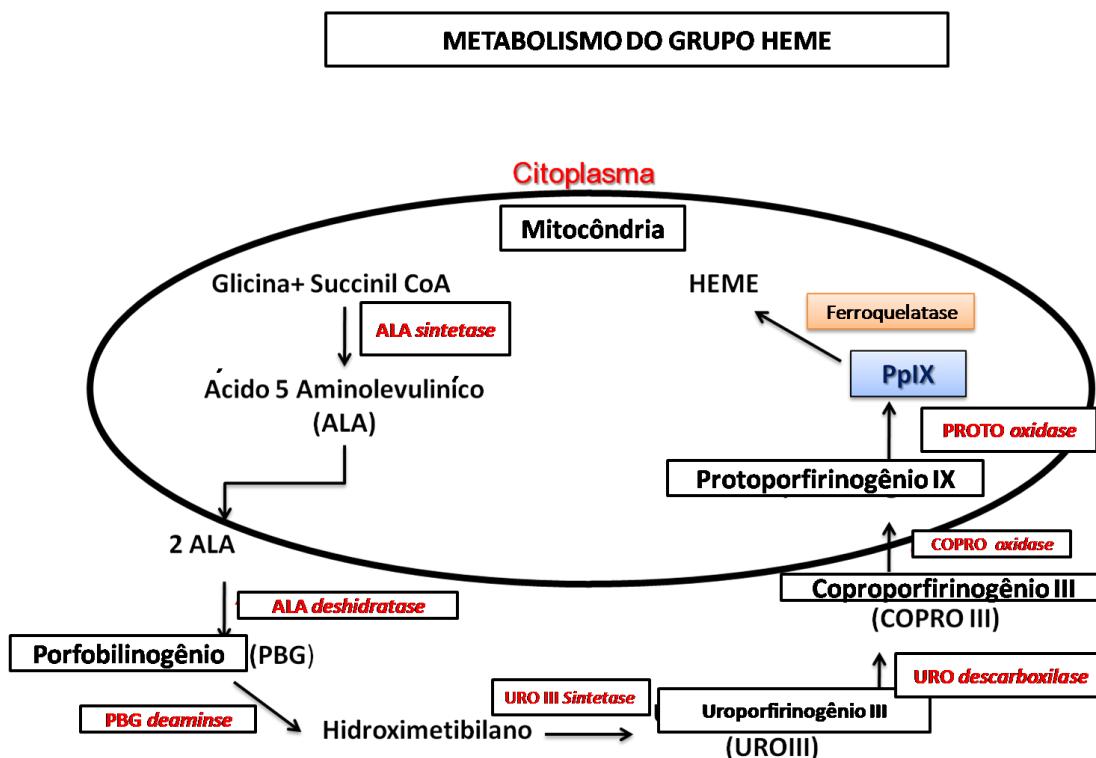


Figura 1: Metabolismo do grupo heme. O ALA é sintetizado a partir da glicina e succinil-CoA. Após ser metabolizado por diferentes enzimas é convertido em protoporfirina IX. Adaptado (TOREZAN; NIWA e NETO, 2009)

O ALA é o primeiro intermediário na via de biossíntese do grupo heme, sendo sintetizado a partir da glicina e succinil – CoA, no interior da mitocôndria. Depois, no citoplasma da célula, a enzima ALA-deshidratase induz a condensação de 2 moléculas de ALA para produzir 2 moléculas de água e porfobilinogênio (PBG), a junção de 4 moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III. Posteriormente, é convertido em coproporfirinogênio III e exposto à enzima coproporfirina oxidase III e produz protoporfirinogênio IX que e é convertido em PpIX, pela ação da protoporfirinogênio oxidase (Figura 1).

O acúmulo da PpIX no interior da mitocôndria induz a sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular, que são alvos da TFD (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI e SALA, 2007b; TOREZAN L., 2009).

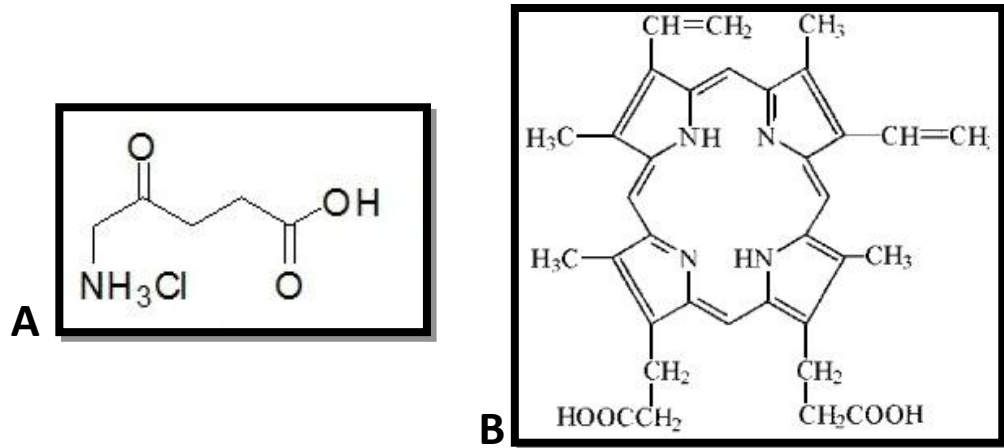


Figura 2:(A) Estrutura química do ácido 5- Aminolevulínico; (B) Estrutura química da Protoporfirina IX.

A Pp IX apresenta 5 bandas de absorção, apesar da região do 630 nm não ser a mais eficiente é usada uma vez que se encontra dentro da janela biológica do espectro eletromagnético (600 a 800 nm), faixa espectral onde substâncias como a melanina, hemoglobina e a água não absorvem nem refletem a luz e esta apresenta uma considerável penetração no tecido biológico .

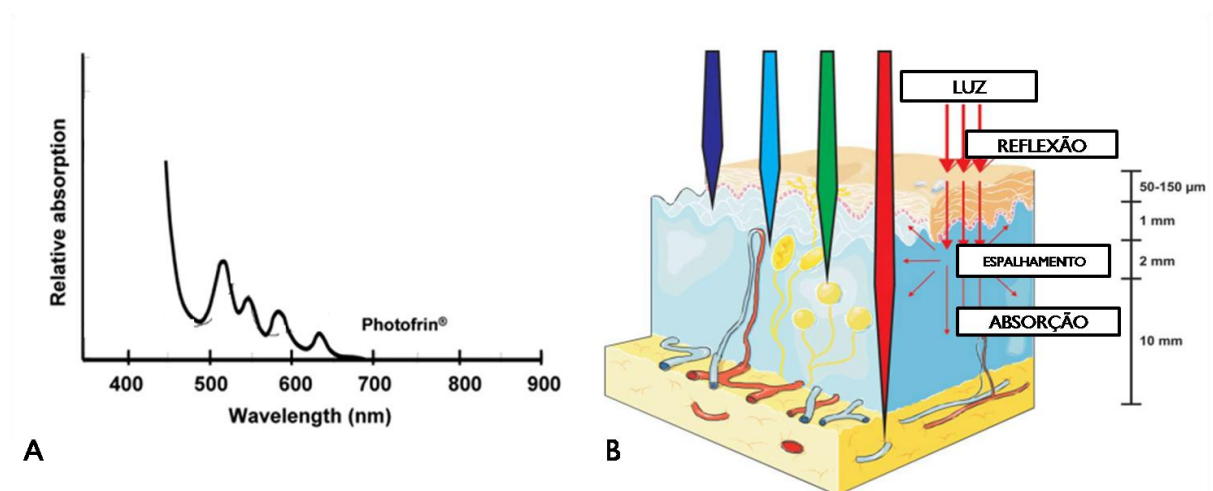


Figura 3: (A) Espectro de absorção do Photofrin®, apresentando 5 bandas de absorção, Adaptado (WILSON; PATTERSON, 2008). (B) Propagação da luz dentro do tecido, adaptado (AGOSTINIS et al., 2011).

Depois da absorção da luz pelo FS, ele passa do estado fundamental a um estado excitado (triplete), e neste estado pode participar de dois tipos de reações como explica a **Figura 4**. Na reação do tipo I ocorre uma transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio entre o FS no estado tripleto excitado e as moléculas biológicas (fosfolipídios, colesterol, proteínas, entre outros) (BAGNATO, 2008), gerando radicais ou íons- radicais. A maioria desses radicais reage instantaneamente com o oxigênio e geram uma variedade de intermediários altamente reativos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^{\cdot}) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (FREITAS; BARONZIO, 1991; OCHSNER, 1997a; TROMBERG et al., 1990).

Na reação do tipo II, é formado o oxigênio singleto (1O_2), que é um dos agentes citotóxicos mais importantes produzidos durante a TFD e o responsável pela fotoinativação das células do tumor. Ele é gerado via processo de transferência de energia durante uma colisão do sensibilizador, produzindo a inversão do spin de um dos elétrons mais externos da molécula de oxigênio, o que resulta na forma altamente reativa de oxigênio (**Figura 4**).

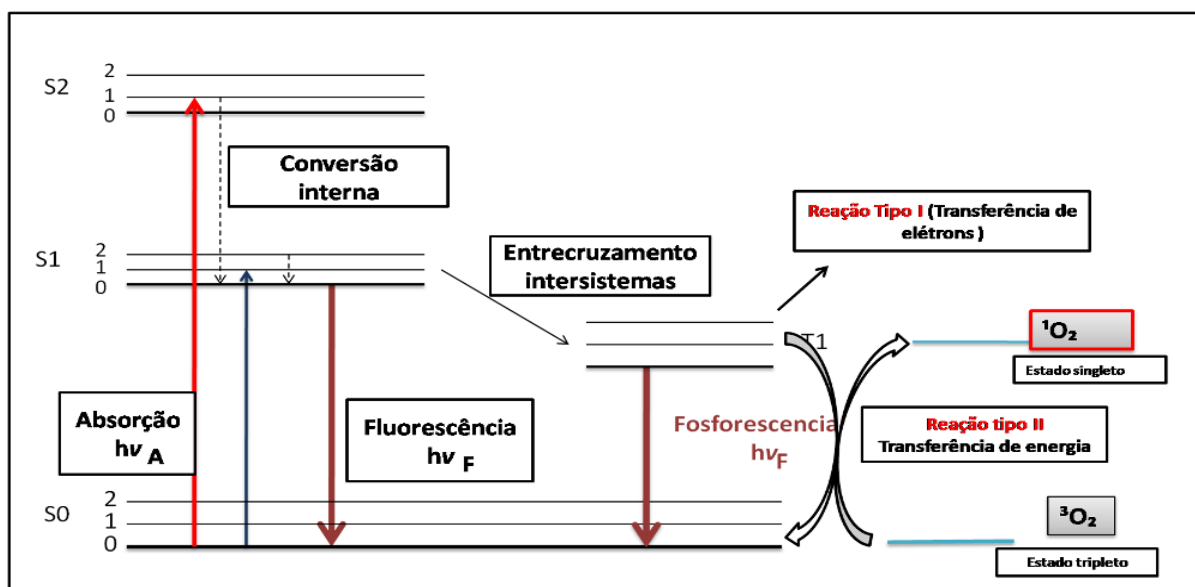


Figura 4: Diagrama de Jablonski modificado. O FS após absorver um fóton passa do estado fundamental ao estado excitado podendo participar de dois tipos de reações. Na reação **tipo I** o FS em seu estado excitado participa em reações de transferência de elétrons gerando radicais ou íons radicais. Na reação **tipo II** é formado oxigênio singleto (1O_2) através da transferência de energia entre o FS excitado e o oxigênio molecular (3O_2).

A interação do $^1\text{O}_2$ com constituintes celulares ocasiona danos à membrana celular, mitocôndrias, lisossomos e núcleo induzindo à morte celular. Após a morte celular, há liberação de mediadores inflamatórios como histamina e metabólitos do ácido araquidônico aumentando os efeitos deletérios (FREITAS; BARONZIO, 1991; OCHSNER, 1997b; TROMBERG et al., 1990). O oxigênio singlete possui tempo de vida em água de aproximadamente 3 microssegundos (OCHSNER, 1997b). Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido, atuando apenas onde é produzido. Esse efeito é muito importante para a TFD, que se baseia no efeito fotodinâmico localizado.

1.3 Mecanismo de morte celular

Três processos diferentes de morte celular podem ocorrer depois da TFD, o primeiro é a necrose direta do tecido que é devido ao dano que produz a TFD às células, processo observado dentro de minutos após a exposição à luz, e caracterizado por intumescimento citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática, liberação e exposição celular do conteúdo das diferentes organelas ao espaço extracelular (DOUGHERTY et al., 1998).

A apoptose ou morte celular programada é o resultado das alterações morfológicas e bioquímicas celulares em diferentes organelas. Através da ligação do FS aos receptores da membrana externa da mitocôndria e/ou pela ação das espécies reativas de oxigênio, é feito um dano à membrana mitocondrial (causa principal da liberação de fatores de iniciação da apoptose), com consequente liberação ao citosol de ativadores das caspases como o citocromo-C e outras moléculas protoapoptóticas incluindo o fator indutor da apoptose, que vão desencadear o processo de apoptose (DOUGHERTY et al., 1998; FANTINI et al., 2008).

O dano vascular é a terceira forma de morte por TFD. Neste processo ocorre uma lesão específica e irreversível das células endoteliais dos vasos intratumorais, que leva a um processo inflamatório e estase do fluxo sanguíneo. Esse mecanismo começa pela ação do oxigênio singlete e dos radicais livres sobre as células

endoteliais, dano que produz agregação e ativação das plaquetas. Após ativadas, as plaquetas liberam substâncias pró-constritoras (tromboxanos), causando a diminuição da luz do vaso sanguíneo e maior agregação plaquetária, mecanismo que vai resultar na formação de trombos, produzindo déficit de fluxo sanguíneo e causando hipoxia e déficit de nutrientes que facilitam a morte das células tumorais (FINGAR, 1996).

1.4 Cicatrização

Para sobreviver é necessário que o corpo seja capaz de substituir as células lesadas e restaurar o tecido, decorrente da lesão por agentes mecânicos, químicos, térmicos e bacterianos. Nesta tentativa, surge uma série de eventos dinâmicos desencadeados por sinais bioquímicos e com participação de diferentes células que vão regenerar e reparar o tecido pré-existente. O processo da cicatrização tem sido dividido em três fases que se sobrepõem, inflamação, proliferação e remodelagem (GURTNER et al., 2008).

1.4.1 Inflamação

A inflamação começa imediatamente depois de ocorrida a lesão, com o extravasamento de sangue, células imunológicas e proteínas como a fibrina (**Figura 5**). Como resposta ao trauma e para evitar excessivo sangramento ocorre uma intensa vasoconstrição mediada por tromboxano A₂ e prostaglandina 2- α (BROUGHTON; JANIS e ATTINGER, 2006), seguida pela formação de um tampão composto de plaquetas (hemostasia) e criação de uma matriz de fibrina provisória, útil para a chegada das células inflamatórias, concentração de citocinas e de fatores de crescimento (BROUGHTON; JANIS e ATTINGER, 2006) (**Figura 6**).

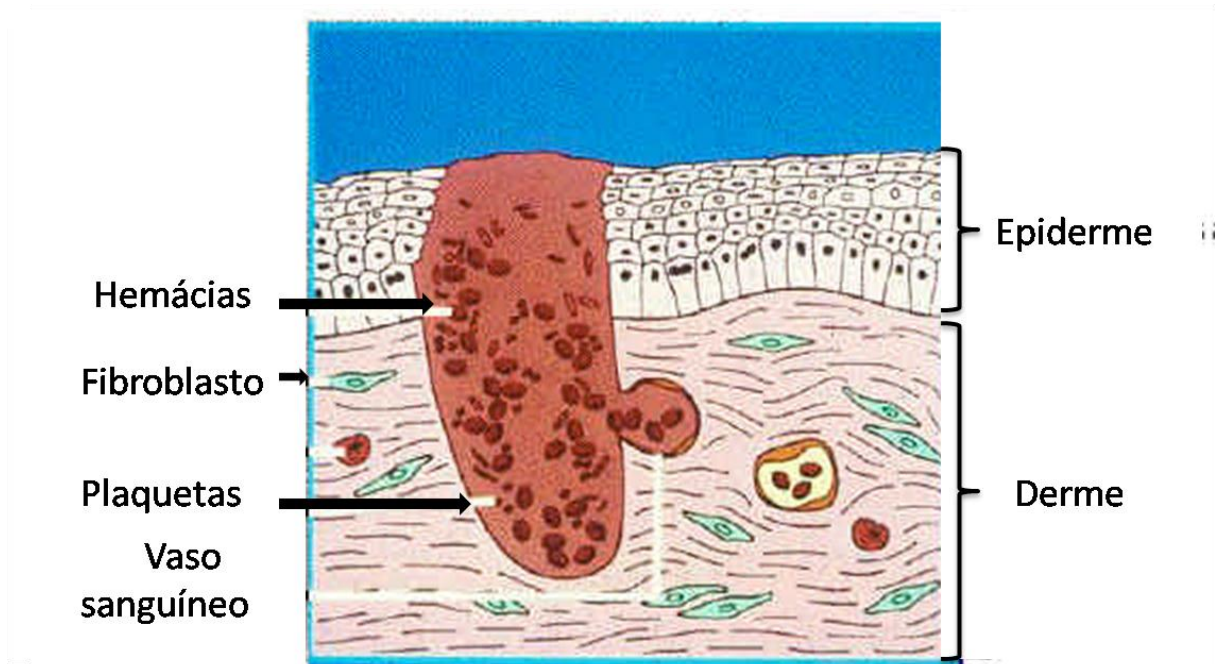


Figura 5: Processo inflamatório após a lesão. Há extravasamento de hemácias e plaquetas, estas últimas encarregadas da formação do tampão hemostático. Adaptado de Diegelmann, Evans(2004).

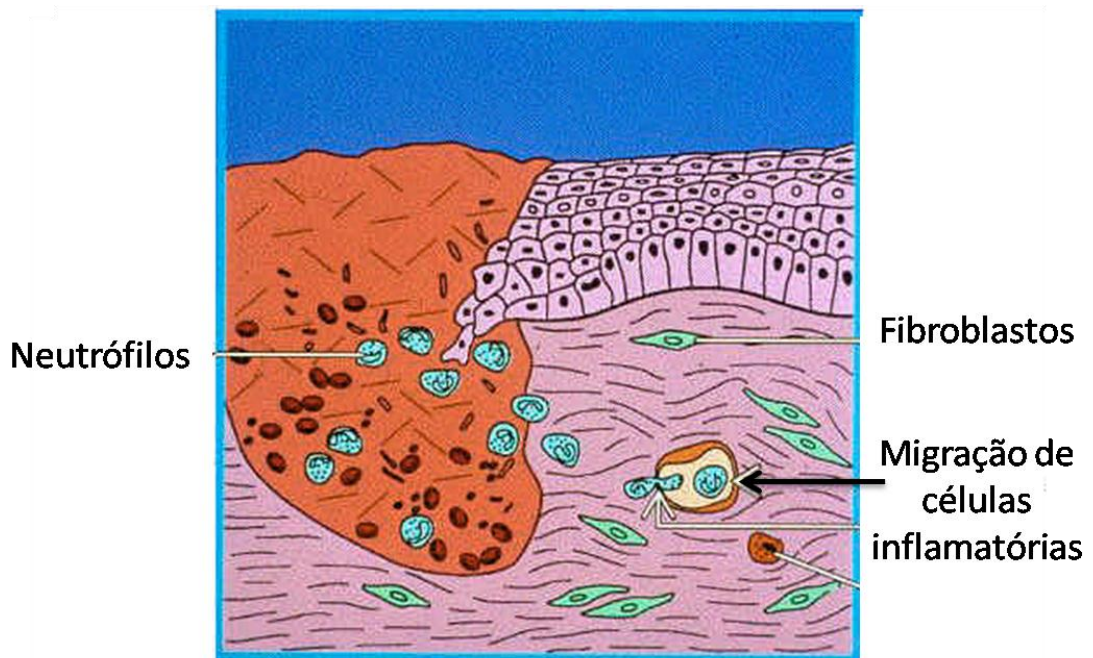


Figura 6: Processo inflamatório. Migração de plaquetas e células imunológicas (neutrófilos e macrófagos) ao local da lesão. Adaptado de Diegelmann, Evans.(2004).

Em resposta aos sinais quimiotáticos, os neutrófilos ou polimorfonucleares são os primeiros elementos a chegar ao local do ferimento, iniciando o debridamento do tecido lesado e destruição dos agentes infecciosos através da liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases entre outros.

Depois de aproximadamente dois dias da lesão, é recrutada a maior quantidade dos macrófagos (monócitos intravasculares), que além de sua função fagocitária, secretam fatores quimiotáticos e importantes fatores de crescimento como o fator transformador de crescimento α e β (TGF- β , TGF- α), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial (EGF), entre outros que promove a proliferação celular e a síntese da matriz extracelular (MEC) (DIEGELMANN; EVANS, 2004; EMING; KRIEG e DAVIDSON, 2007).

As plaquetas, por sua parte, liberam fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), substâncias necessárias para estimular a formação do tecido de granulação.

O TGF- β e os subtipos são substâncias importantes neste processo porque pode acelerar ou prejudicar o processo de cicatrização pela sua atividade imunomoduladora. Esta citocina pode atrair maior quantidade de macrófagos e estimular a secreção de citocinas como FGF, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1(IL1) (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Além disso, modula a expressão de colágeno, as colagenases, os inibidores de proteases e inibidores de metaloproteases (TIMP), tendo um papel importante nas alterações da cicatrização e formação de queloides (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

1.4.2 Proliferação

Fase proliferativa ou de re-epitelização ocorre entre o 2º e 10º dia depois do trauma e é caracterizada pela proliferação e diferenciação das células (GURTNER et al., 2008). Duas células são as protagonistas desta fase, 1) os fibroblastos, que migram até o local da ferida provenientes do tecido circundante e produzem os componentes da MEC e, 2) as células endoteliais, que proliferam a partir de vênulas próximas, formando novos capilares, processo chamado de angiogênese. A neo-

angiogênese é responsável pela nutrição do tecido e por continuar com o aporte de outras células tais como macrófagos e fibroblastos (WITTE; BARBUL, 1997).

A função primordial dos fibroblastos é a síntese do colágeno, que deve ser depositada de uma forma organizada, uma vez que um aumento do depósito do mesmo pode levar a cicatrizes hipertróficas e/ou quelóides.

A síntese do colágeno começa nos ribossomos, com a transcrição e processamento do ácido ribonucleico mensageiro (RNA-m), resultando na formação das cadeias α . Posteriormente, ocorre uma oxidação dos resíduos de lisina e prolina (hidroxilação), processo dependente da vitamina C. No escorbuto ou déficit de vitamina C, o colágeno é sintetizado anormalmente e torna-se muito friável, produzindo hemorragias com leve trauma e pobre cicatrização (GANTWERKER; HOM, 2012). Na sequência, três cadeias α após várias modificações enzimáticas se alinham e formam a tripla hélice ou procolágeno (MONACO; LAWRENCE, 2003).

Já no espaço extracelular a enzima procolágeno peptidase quebra a maioria dos peptídeos de registro transformando o procolágeno em tropocolágeno que se agrega na forma de fibras, consolidando a arquitetura final e favorecendo a resistência do colágeno.

Pelo menos 13 tipos diferentes de colágeno foram identificados sendo os tipos I e III os de maior importância na pele. O colágeno tipo I é a forma predominante e representa aproximadamente 90% do total do colágeno em derme normal; ele apresenta-se na forma de fibrilas estriadas de 1 a 20 μ m, agrupando-se em fibras colágenas maiores e sua função principal é a resistência ao estiramento (USHIKI, 2002). O colágeno tipo III é o componente fundamental das fibras reticulares (aproximadamente 2 μ m de diâmetro), e sua função é de sustentação dos órgãos e vasos sanguíneos (USHIKI, 2002). Na pele normal, este tipo de colágeno se apresenta em uma proporção menor ao tipo I, aproximadamente 4:1. Em lesões hipertróficas e cicatrizes imaturas pode aumentar numa taxa de 33% do colágeno total, alterando a proporção entre colágeno tipo I e III de 2:1 (STADELMANN; DIGENIS e TOBIN, 1998).

Outros componentes da matriz extracelular que são sintetizados nesta etapa são, por exemplo, os proteoglicanos (dermatan sulfato, ácido hialurônico) que contribuem para a estabilidade e viscosidade da pele.

As células epiteliais migram desde as bordas sobre a área da ferida induzindo a contração e a re-epitelização. A epitelização envolve uma sequência de alterações nos queratinócitos como a separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação (GURTNER et al., 2008) (**Figura 7**).

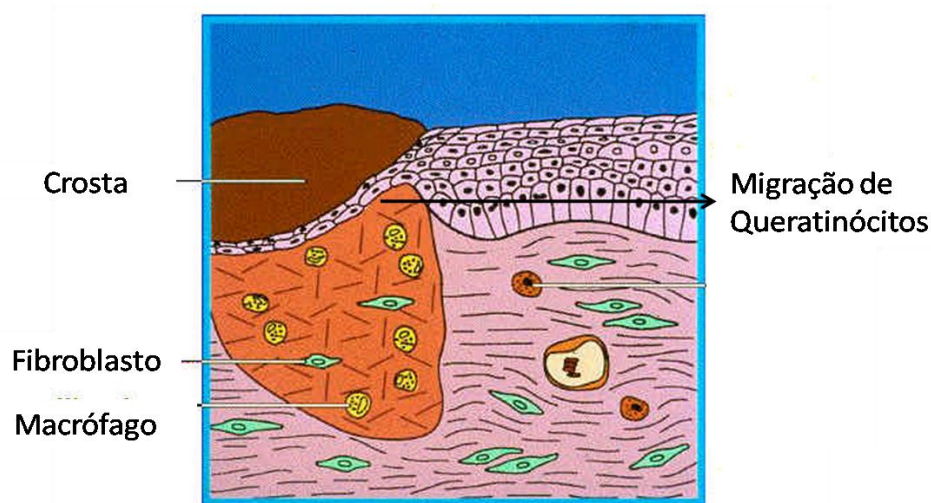


Figura 7: Processo de proliferação. Ocorre migração de fibroblastos e queratinócitos (re-epitelização). Adaptado de Diegelmann, Evans (2004).

1.4.3 Remodelagem

Na remodelagem da ferida, observa-se uma contração da ferida por meio do movimento centrípeto das bordas feita pelos miofibroblastos (modificação dos fibroblastos). Além disso, ocorre uma maturação e reorganização dos elementos da MEC, o colágeno tipo III é substituído pelo o colágeno tipo I, processo feito pelas metaloproteases transformando a matriz provisória em definitiva (**Figura 8**) (GURTNER et al., 2008; MADDEN; PEACOCK, 1971). As metaloproteases (MMP) são enzimas proteolíticas caracterizadas pela habilidade de degradar vários componentes da matriz extracelular. Sua expressão pode ser estimulada por diferentes tipos de células tais como queratinócitos, fibroblastos, monócitos, linfócitos e macrófagos e algumas citocinas tais com (EGF), Fator de crescimento

dos queratinocitos (KGF), e TNF- α entre outros (MARTINS; CALEY e O'TOOLE, 2012). Os TIMPs são proteínas inibidoras das MMP e sintetizadas por fibroblastos. Um balanço entre a expressão dos componentes da MEC, os componentes de degradação e seus inibidores é necessária para ocorrer uma adequada cicatrização da ferida (MARTINS; CALEY e O'TOOLE, 2012).

Os macrófagos começam a desaparecer, enquanto a angiogênese e a produção de fibroblastos diminuem. Devido ao processo de remodelação que pode durar até um ano depois da ferida, a força tênsil vai se incrementado como resultado da formação dos enlaces cruzados do colágeno (KARUKONDA et al., 2000). Segundo Monaco, et al. (2003), a força tênsil da ferida cicatrizada após 1 semana é de apenas 3% da pele normal, 20% após 3 semanas e depois de 3 meses pode ser chegar até aproximadamente 80% da pele sadia.

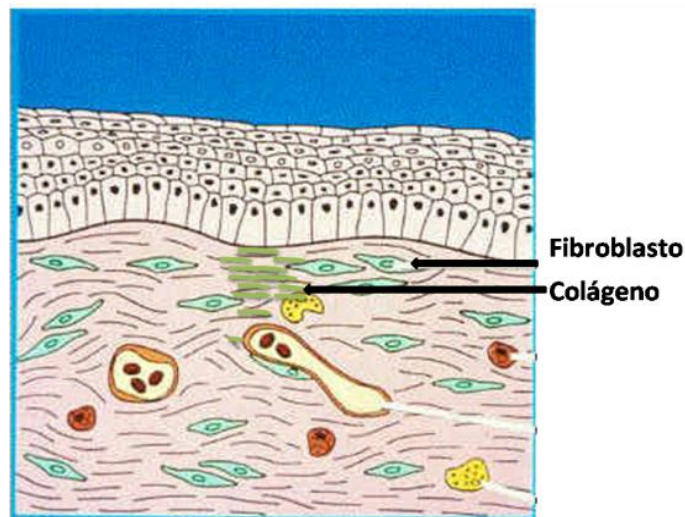


Figura 8: Processo de remodelagem. Ocorre uma reorganização do colágeno sendo substituído o tipo I pelo III. Adaptado de Diegelmann, Evans (2004).

1.5 Terapia Fotodinâmica e Cicatrização

A TFD intervém nas diversas etapas da cicatrização e tende a acelerar o reparo tecidual (GARCIA et al., 2010; HAMBLIN et al., 2002; LIAPINA et al., 2010; SILVA et al., 2004; STERN et al., 1990).

Na fase inflamatória foi demonstrado que lesões tratadas com TFD apresentam menor quantidade de infiltrado inflamatório (GARCIA et al., 2010), isso atribuído à sua comprovada ação de controle microbiológico e descontaminação (JORI et al., 2006; MAISCH et al., 2004). Além disso, foi comprovada a diminuição da quantidade e da atividade dos leucócitos trazendo como resultado final redução do tempo total desta fase (LIAPINA et al., 2010).

Um começo precoce da etapa da re-epitelização da ferida após TFD foi evidenciado nos estudos de Garcia et al.(2010), Silva et al. (2004) e Sperandio et al. (2010) com presença precoce de fibroblastos jovens, fibrina e tecido de granulação quando comparado ao grupo controle. Segundo Garcia et al. (2010), a TFD mostrou efeitos positivos sobre a deposição de colágeno, proliferação e angiogênese após 3,7 e 14 dias da indução de uma queimadura de terceiro grau em modelo animal, quando comparados ao grupo controle. Em um estudo feito em modelo animal, com intensidades e doses finais de 25, 50, e 75 J/cm² (comparadas às aplicadas em humanos) não foram encontradas diferenças significativas na força tênsil entre os animais tratados com TFD e não tratados até 21 dias depois do tratamento (BROUWER et al., 2000).

Para a lesão ser remodelada com êxito é necessário ter um equilíbrio entre a síntese da MEC e a degradação da mesma. O desequilíbrio neste processo pode causar alterações na qualidade estética da cicatrização. Neste processo de remodelação, em lesões tratadas com MAL e TFD depois de três sessões foi observado um aumento do TGF- β 1 e β 3 que favoreceu o controle na deposição ordenada das fibras de colágeno (FARRAR et al., 2011). Nesta etapa da cicatrização também participam as MMP para degradar o colágeno, e assim remodelar a matriz extracelular. Num estudo *in vitro* em cultura de fibroblastos humanos tratados com TFD foi evidenciado uma indução da síntese de MMP I e III, que pode favorecer o processo de remodelação (CHOI et al., 2010; KARRER et al., 2003). Nesta mesma linha, Almeida et al., (2009) observou um aumento significativo da MMP-9, após 3 meses de MAL-TFD (duas sessões) quando comparado ao grupo controle sugerindo a remodelação da matriz extracelular. Segundo CHOI, et al.

(2010) em um modelo experimental em animal, depois de uma sessão de TFD encontrou elevação das citocinas como IL-1, TGF- β e TNF- α e MMP (1,2,3 e 9) com um incremento na expressão do procolágeno-I quando comparado com os grupos que não foi realizado TFD, concluindo que após da TFD apresentassem mudanças na matriz dérmica que leva como resultado a remodelagem da mesma. Em geral, o tempo total da cicatrização das feridas é reduzido com a TFD quando comparado com o controle (JAYASREE et al., 2001). No entanto, Parekh et al (1999) num experimento feito em um modelo animal com dois FS diferentes (um derivado de benzoporfirina e uma clorina) e aplicação da TFD, os autores não encontraram diferença entre a ferida tratada e a não tratada do rato.

Em uma revisão da literatura de trabalhos usando TFD e cicatrização, Peplow et al.(2012) concluíram, que a TFD em doses baixas e usada em feridas agudas podem apresentar melhores resultados quando comparado com o uso de laserterapia, mas, sugerem maiores estudos, com padronização de técnicas e uso de modelos animais com maior sensibilidade a alterações no processo de cicatrização.

1.6 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma técnica que permite a aquisição de planos ópticos da amostra para construir imagens tridimensionais permitindo uma grande definição da imagem. Para formar a imagem um ou mais feixes do laser varrem a amostra em sentido linear ponto por ponto até iluminar toda a amostra.

Uma melhoria da microscopia confocal é a microscopia multifótons, onde os fluoróforos são excitados por absorção de 2 fótons. Desta forma, a energia dos dois fótons é somada e juntos estimulam da mesma forma que ocorre com a absorção de um fóton com o dobro da energia, assim, oferece algumas vantagens, como estudo de uma maior profundidade com menor dano da amostra por fototoxicidade.

Outro fenômeno que pode ser explorado na microscopia multifótons é a geração do segundo harmônico (SHG do inglês *second harmonic generation*), que

se diferencia da fluorescência por ser um processo com energia conservada. Porém, o fóton resultante tem exatamente a soma das energias dos fótons incidentes. Para SHG, é necessário que a estrutura avaliada apresente uma extrema organização, simetria entre outras propriedades (ZOUMI; YEH e TROMBERG, 2002). Atualmente, a microscopia multi-fótons e a SHG são utilizadas para avaliação da morfologia e função dos tecidos biológicos.

A técnica SHG está sendo usada para a avaliação do tecido conjuntivo principalmente na análise do colágeno de tipo I, devido a sua estrutura de tripla hélice helicoidal não centro-simétrica (envelopada a direita), tendo a capacidade de geração do segundo harmônico (LV et al., 2012), ao contrário dos outros tipos de colágeno. Na literatura médica, alguns trabalhos têm sido publicados avaliando o colágeno e as fibras elásticas com esta técnica tanto *ex vivo* como *in vivo* (CHEN et al., 2011; LU et al., 2009). Chen et al. (2009), avaliou amostras *ex vivo* de pacientes com cicatrizes hipertróficas, apresentando imagens características da microestrutura das fibras que compõem a MEC. Foi evidenciada neste estudo a disposição e organização das fibras de colágeno e elastina da pele normal apresentando diferença com a disposição desorganizada apresentada na cicatriz hipertrófica (CHEN et al., 2009). Em outro trabalho feito por Lu et al. (2009), foi apresentada a disposição desorganizada das fibras de colágeno, se evidenciando também fibras de maior espessura e com orientação paralela em pele com esclerodermia. Num estudo mais recente, foi avaliada *in vivo* a pele de rato após várias sessões de TFD (em total 12, com uma semana de espaçamento entre cada) usando ALA 3% e dose de 1.2 J/cm^2 como terapia para rejuvenescimento cutâneo. Após 12 semanas de terminado o tratamento, foi feita uma avaliação das fibras de colágeno, se apresentando nos animais tratados fibras mais uniformes e organizadas e com maior densidade, sem encontrar diferença significativa na geração do segundo harmônico entre os grupos tratados (LV et al., 2012).

2. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

A TFD é uma técnica relativamente nova que está sendo bastante usada em câncer e outras doenças da pele, devido a suas vantagens como alta seletividade, excelente resultado estético, e poucos efeitos colaterais quando comparada às técnicas convencionais.

Em dermatologia oncológica, diferentes protocolos que incluem uma ou várias sessões estão sendo testados com o intuito de destruir as células malignas preservando o tecido normal. Também para o tratamento ou controle de outras condições da pele, como ceratose actínica, acne, infecções bacterianas e fúngicas, a TFD está sendo utilizada. Desta forma, é importante aprimorar o entendimento do comportamento dessa pele irradiada e tratada com a terapia fotodinâmica especialmente quando submetida a várias sessões com o intuito de ampliar o conhecimento e consolidar a técnica.

3. OS OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar o comportamento da pele cicatrizada após uma ou várias sessões de TFD e analisar sua resposta a agressões padronizadas feitas com o laser de CO₂.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliação macroscópica das características (Eritema, hipertrófia, atrófica, hiperpigmentação e hipopigmentação) da pele submetida a várias sessões de TFD
- Avaliação macroscópica do comportamento da pele cicatrizada (após várias sessões de TFD) quando submetida a traumas externos.
- Avaliação microscópica das unidades pilosebáceas e os fibroblastos da derme após submetida a pele a várias sessões de TFD e traumas externos.
- Avaliação qualitativa da geração do segundo harmônico e das características microestruturais do colágeno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Animais

Foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 200g, provenientes do Biotério do departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um alojamento para animais com 4 filtros para entrada do ar e 1 exaustor de saída no laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos. Ficaram alojados em gaiolas coletivas (4 animais/gaiola) de polietileno com tampas metálicas e assoalho forrado com maravalha. Receberam água filtrada e ração comercial específica para roedores biobase. A temperatura foi mantida entre 23° e 25°C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas.

Todos os experimentos apresentados nesta dissertação foram aprovados pelo Comitê de Ética e pesquisa no uso de animais da Universidade Federal de São Carlos sob o número de protocolo nº 047/2011 (anexo I).

4.1.2 Fotossensibilizador

O pró-fármaco utilizado foi o 5-ácido Aminolevulínico (ALA) proveniente da PDT-Pharma (Cravinhos, Brasil). Este princípio ativo para TFD foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (autorização nº 108495.1, publicada em D.O.U. em 21 de setembro de 2010). O ALA é um precursor da Pp IX na via biossintética do grupo HEME. É um pó branco contido em frascos esterilizados de 50ml contendo 1.5 g envolvidos em papel alumínio para proteção da luz e guardado em geladeira a temperatura de 4°C. O pó antes de ser utilizado foi

misturado com 1mM EDTA, 3% DMSO e creme base sendo sua concentração final 20% p/p.

4.1.3 Fonte de luz

O comprimento de onda para iluminação na TFD foi escolhido, considerando o espectro de absorção do fotossensibilizador. A Pp IX tem 5 bandas de absorção, uma delas está centrada em 630nm (vermelho), apesar de não ser uma banda de absorção relevante é usado este comprimento de onda por se encontrar na janela biológica terapêutica. Para a irradiação neste estudo foi utilizado como fonte de luz, um laser de diodo (Eagle Heron 630, QuantumTech[®], São Carlos, Brasil), com potência óptica de até 2 W. A entrega da luz foi realizada acoplando uma fibra óptica de iluminação direta (**Figura 9**).

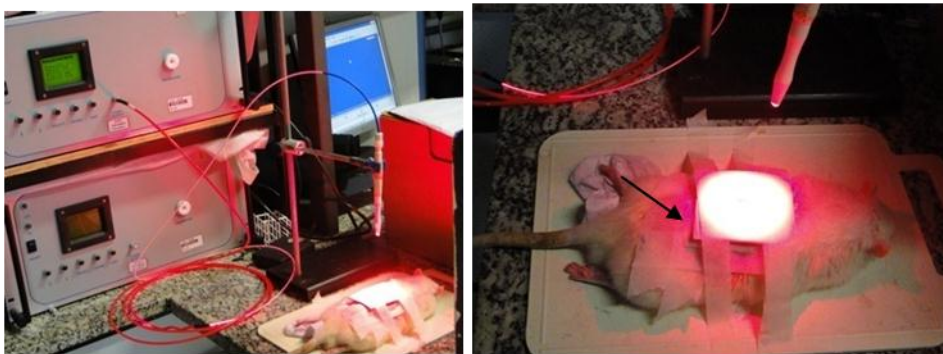


Figura 9: Iluminação da pele do rato com o Laser. Observe-se a máscara de proteção sobre a pele para evitar a iluminação de regiões além da área de interesse.

4.1.4 Laser de CO₂

Foi usado um Laser de CO₂ que emite na região do 10.600 nm (infravermelho distante), Modelo KSV 25S, MedicalEnergy, Inc., Pensacola, FL, EUA (**Figura 10**). Este equipamento foi escolhido por permitir uma padronização da profundidade da lesão. Foi usado o modo pulsado com frequência de 40Hz e uma potencia de 30W.



Figura 10: Laser de CO₂.

4.2 Métodos

Para a elaboração do protocolo de tratamento foi feito um estudo piloto com o intuito de escolher a melhor dose de irradiação, sendo avaliadas tanto características da lesão feita pela TFD na pele sadia como o tempo de cicatrização da mesma (apêndice I).

4.2.1 Terapia Fotodinâmica

a) Preparo dos animais

Foram utilizados 25 animais, divididos em 5 grupos com 5 animais por cada grupo: G0, G1, G2, G3, G4. A Figura 11 apresenta a divisão dos grupos experimentais de acordo com a quantidade de sessões feitas.

Inicialmente foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de Cloridrato de ketamina a 10% (Ketamina, Agener) na dose de 0,08ml/100g de peso corpóreo associado a relaxante muscular, analgésico e sedativo, cloridrato de Xilazina 2%, (Coopazine®) na dose de 0,04ml/100g.

Posteriormente, foram submetidos à tricotomia no dorso, uma área de 3X3 cm aproximadamente.

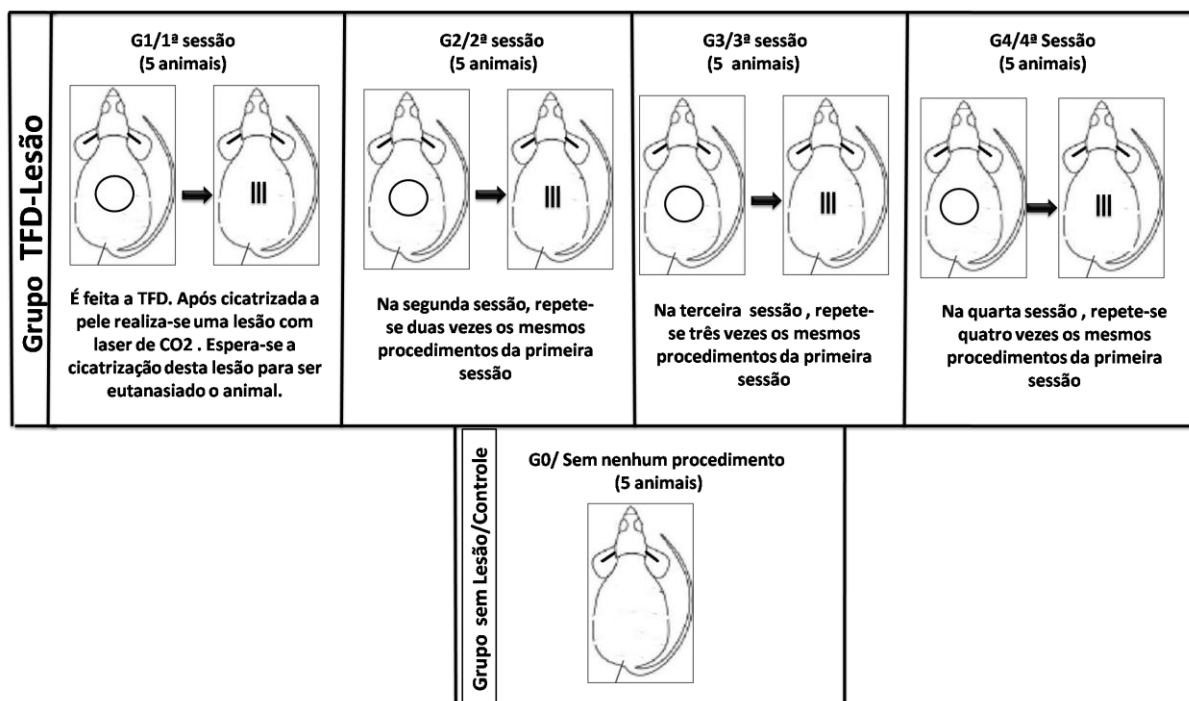


Figura 11: Representação gráfica dos diferentes grupos de animais utilizados na pesquisa. G0, grupo controle, não recebeu nenhum tratamento; G1, grupo submetido a uma sessão; G2, submetido a duas sessões; G3, submetido a três sessões; G4, submetido a 4 sessões consecutivas.

b) Aplicação do creme com ALA 20%

O creme contendo ALA é aplicado na pele previamente tricotomizada, e coberta com papel filme de PVC e papel alumínio para evitar a fotoativação (**Figura 12**). Após duas horas de oclusão, é retirado o excesso de creme usando uma gaze embebida em solução salina 0,9% e é colocada uma máscara feita de papel alumínio e gaze sobre a pele com um orifício de 2x2. Esta máscara delimitou a área desejada a ser irradiada.



Figura 12: Rato com pele coberta com papel alumínio para evitar a fotossensibilização da medicação.

c) Irradiação

Todos os ratos foram irradiados com um laser de Diodo. A dose entregue foi de $30\text{J}/\text{cm}^2$, com uma intensidade de $50\text{mW}/\text{cm}^2$ e um tempo de 10 minutos (600 segundos). Esses parâmetros foram previamente definidos no estudo piloto (apêndice I). Após a irradiação, os animais foram mantidos no alojamento e avaliados diariamente. Os parâmetros que foram utilizados para determinar o término da cicatrização foram:

- Fechamento total da ferida
- Ausência de crosta na área lesada
- Ausência de sangramento ou de qualquer outra secreção fisiológica

4.2.2 Lesão da pele feita com laser de CO_2

a) Preparo do animal

Depois de cicatrizada a pele dos animais tratada com TFD, o animal foi preparado para a realização de uma lesão com laser de CO_2 . Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular com solução de Cloridato de Quetamina a 10% (KetaminaAgener) na dose de $0,08\text{ml}/100\text{g}$ de peso corporal associado a

relaxante muscular, analgésico e sedativo cloridrato de Xilazina 2% (Coopazine®) na dose de 0,04ml/100g

b) Ablação a laser

Três lesões paralelas de aproximadamente 1cm de comprimento foram realizadas na pele cicatrizada previamente tratada com TFD, como apresentado na **Figura 13**. Novamente, as lesões foram avaliadas diariamente e os critérios para determinar o tempo de cicatrização da pele foram os mesmos escolhidos para cicatrização da TFD e descritos anteriormente. Fotografias digitais foram obtidas.



Figura 13: Lesão feita com Laser de CO₂.

4.2.3 Eutanásia, remoção e preparo do material

Após o termino de cada sessão, os animais foram eutanasiados por inalação de gás CO₂ de acordo com a **Figura 14**. Posteriormente, com auxílio de um bisturi a pele tratada foi removida até a fáscia muscular dorsal. As peças foram colocadas em frascos plásticos contendo solução tamponada de formol 10 %, e levadas ao laboratório de histologia do Instituto de Física de São Carlos-USP para preparação da lâmina histológica e ao Laboratório de Histologia do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para coloração das mesmas.

G0	G1	G2	G3	G4
<i>Controle</i>	TFD	TFD	TFD	TFD
<i>Controle</i>	Lesão	Lesão	Lesão	Lesão
<i>Controle</i>	Eutanásia	TFD	TFD	TFD
<i>Controle</i>		Lesão	Lesão	Lesão
<i>Controle</i>		Eutanásia	TFD	TFD
<i>Controle</i>			Lesão	Lesão
<i>Controle</i>			Eutanásia	TFD
<i>Controle</i>				Lesão
Eutanásia				Eutanásia

Figura 14: Representação esquemática das diferentes sessões a que foram submetidos os animais de cada grupo. (G0) Grupo que não foi submetido a nenhum procedimento. (G1) Grupo submetido a uma sessão de TFD, posteriormente, na pele cicatrizada foi feita uma lesão externa com laser de CO₂. (G2) O grupo passa duas vezes pelo mesmo procedimento explicado anteriormente. (G3) O grupo passa três vezes pelo procedimento. (G4) O grupo passa pelo procedimento em quatro ocasiões.

4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Depois de cicatrizadas, as lesões foram avaliadas macroscopicamente analisando diversas características clínicas da pele. Para cada parâmetro avaliado foi dada uma qualificação de 0 a 4, sendo 0 ausência da característica e 4 grau máximo de apresentação. Foram avaliados: eritema residual, presença de cicatriz hipertrófica ou atrófica e as mudanças cromáticas. Salientando que os ratos da linhagem Wistar são albinos, os termos hiperpigmentação ou hipopigmentação foram usados para ilustrar mudanças na cor da pele e não para avaliar presença ou ausência de pigmento melânico. Depois, a pele cicatrizada foi fotografada com uma câmera digital Sony DSC-H50.

4.4 Análise Microscópica

As amostras de pele que foram imersas na solução tamponada de formol 10 %, foram posteriormente lavadas com solução de etanol a 70%, para auxiliar na remoção do excesso de líquido fixador e então submetida às seguintes etapas:

- Desidratação: passagem das amostras em banhos de álcool etílico de concentrações crescentes de 70%, 80%, 90%, 95%I, 95%II, 100%I e 100%II (absoluto), durante o período de uma hora cada.
- Diafanização ou clareamento: banhos em álcool-xilol (20 minutos), xilol I (20 minutos) e xilol II (20 minutos) para tornar as peças translúcidas.
- Embebição em parafina: imersão em três cubas contendo parafina fundida na estufa a 60°C, por 30 minutos em cada uma das cubas.
- Inclusão em parafina: as amostras foram colocadas em recipientes contendo parafina fundida (parafina IV) e orientadas na posição adequada para a obtenção dos cortes. Posteriormente, os recipientes foram deixados à temperatura ambiente para solidificação durante 24 horas.

Após a inclusão do material, cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram realizados utilizando-se um micrótomo rotativo (Leica, RM 2125RT, Microsystems NusslochGmGH, Germany) e os mesmos recolhidos em grupos de dois, em lâminas previamente identificadas.

4.4.1 Verhoeff

Nas lâminas coradas foi possível fazer uma avaliação das estruturas celulares (unidades pilossebáceas). Para esta avaliação, foi calculada uma área média por corte, depois o resultado da somatória das estruturas (unidades pilossebáceas) encontradas em cada campo foi dividido pelo número de campos avaliados e multiplicada pela área média dando como resultado a concentração de estruturas por mm².

A **Figura 15** apresenta um folículo ou unidade pilossebácea com seus diferentes componentes. Neste estudo foram contadas as glândulas sebáceas pela maior facilidade de avaliação no corte histológico devido ao maior comprimento da mesma. Para a análise e documentação fotográfica dos resultados obtidos, foi utilizado o microscópio Zeiss®, modelo Axioobserver 2.1. As imagens dos campos utilizados para a contagem, foram registradas pela câmera digital AxioCamERC5s® acoplada ao microscópio, sendo posteriormente analisadas pelo programa Axio Vision 4.8, utilizando objetiva de 5x.



Figura 15: Fotomicrografia demonstrando uma unidade pilossebácea composta pelo folículo piloso e a glândula sebácea. (*)Folículo piloso.Verhoeff 50x.

4.4.2 Tricômio de Mason

Os cortes histológicos foram corados pela técnica de tricrômio de Masson para a avaliação morfológica dos fibroblastos nas camadas papilar e reticular da derme, **Figura 16**. Por esta técnica, as fibras colágenas e os núcleos dos fibroblastos localizados na derme foram corados em azul, diferenciando-se dos vasos sanguíneos, fibras musculares e do endotélio, corados em vermelho. Para esta avaliação, foram escolhidos aleatoriamente em cada corte histológico, dois campos, sendo em cada um deles realizada a contagem do número total de fibroblastos na camada papilar e na

camada reticular da derme, em aumento de 400x (**Figura 17**). Foi calculada a média do número total de fibroblastos em cada camada.

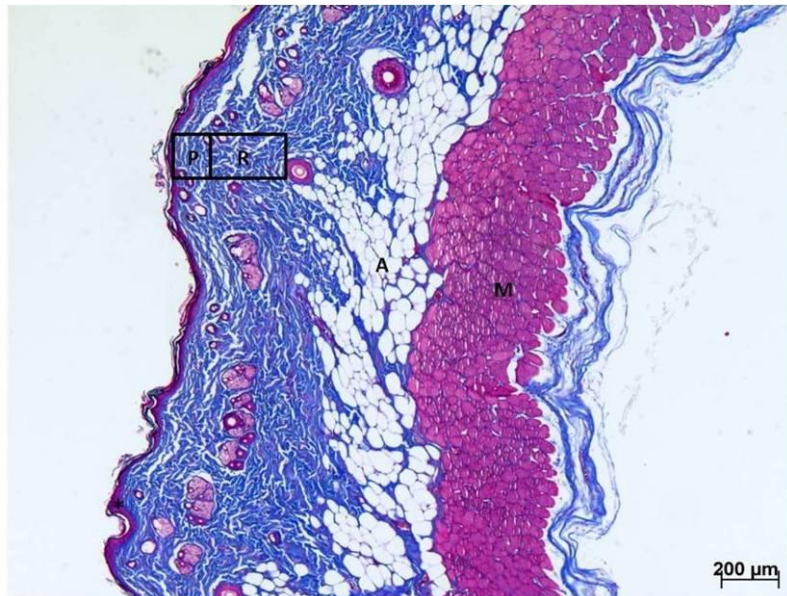


Figura 16: Fotomicrografia demonstrando as camadas do tegumento e a demarcação de um campo para a contagem do número total de fibroblastos nas camadas papilar (P) e reticular (R) da derme. Epiderme (*); hipoderme com células adiposas (A); camada muscular (M). Tricrômico de Masson; 50x.

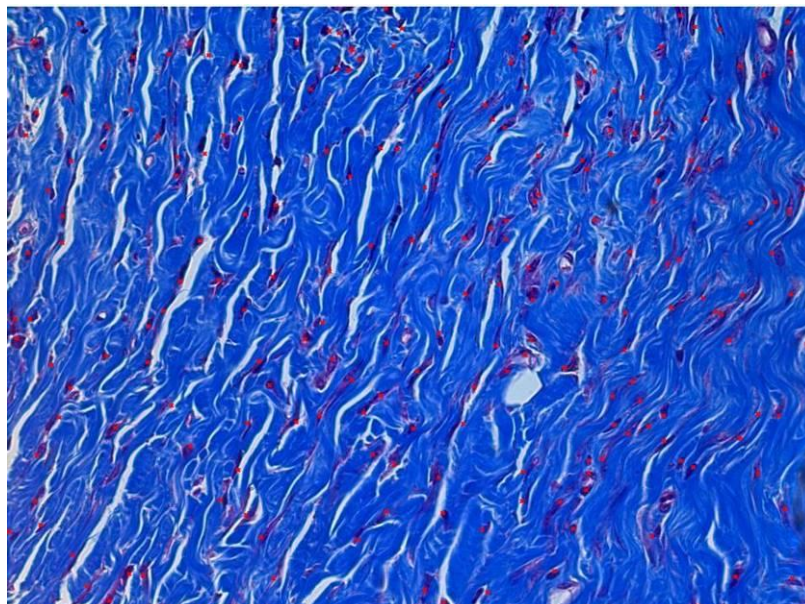


Figura 17: Fotomicrografia demonstrando a marcação (cruz em vermelho) dos núcleos do número total de fibroblastos na camada reticular da derme de um dos campos de um animal do grupo G2. Tricrômico de Masson; 400x.

Para a análise e documentação fotográfica dos resultados obtidos, foi utilizado o microscópio Zeiss®, modelo Axioskop2plus. As imagens dos campos utilizados para a contagem, foram registradas pela câmera digital AxioCamHrc® acoplada ao microscópio, sendo posteriormente analisadas pelo programa Axio Vision 4.6, utilizando objetiva de 40x.

4.4.3 Fluorescência do colágeno corado pela técnica da Hematoxilina-Eosina

Para a avaliação qualitativa das fibras de colágeno nas camadas papilar e reticular da derme foi usado microscopia multifótons, sendo utilizados as lâminas coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. Por esta técnica pode ser avaliada com alta resolução e contraste imagens, da fluorescência e SHG excitadas por dois fótons, do colágeno, analisando características como morfometria, espessura, distribuição e orientação das fibras. Também é possível diferenciar o colágeno de tipo I, o principal emissor de segundo harmônico, dos outros tipos de colágeno que emitem principalmente fluorescência para excitação por dois fótons. Para esta avaliação, foram escolhidos aleatoriamente em cada corte histológico, 6 campos, sendo três na camada papilar e três na camada reticular da derme, usando uma objetiva de 40x (**Figura 18**). Nesta análise, as imagens de microscopia multifótons foram adquiridas com o microscópio confocal invertido LSM780-ZEISS (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A fonte de luz utilizada foi o Laser ChamaleonUltra-II (Coherent, California, EUA) que apresenta comprimento de onda de 800 nm, largura temporal de pulso de 150 fs e taxa de repetição de 80 MHz. A potência acoplada no microscópio foi de 30 mW.

A SHG foi detectada usando um detector por transmissão, comum filtro passa banda na região entre 380-430 nm, sendo o comprimento de onda do segundo harmônico de aproximadamente 400 nm. A fluorescência foi detectada com dois detectores NDD (do inglês, *non descanning detector*). Um espelho dicróico foi usado para separar os fótons com comprimento de onda inferior a 490 nm, direcionados

para o primeiro detector, daqueles com comprimento de onda maior, enviados para o segundo. Foi feita uma avaliação qualitativa do SFG dos campos escolhidos e avaliados anteriormente.

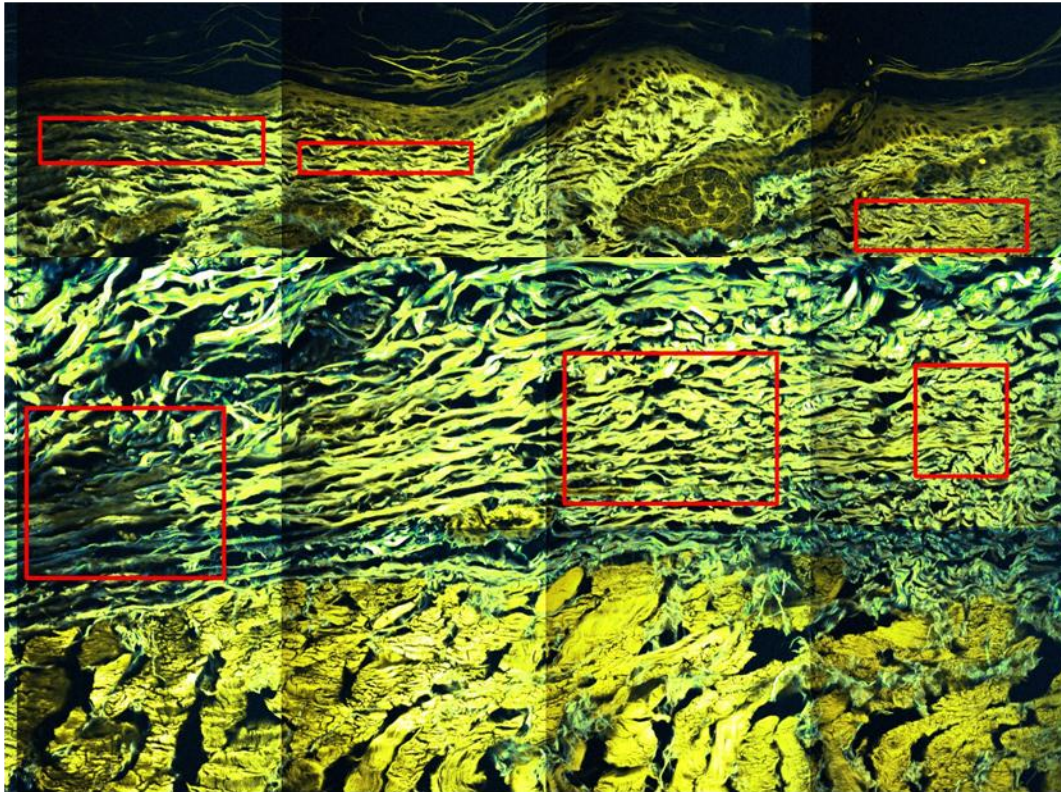


Figura 18: Fotomicrografia demonstrando os lugares escolhidos na lâmina histológica para estudo morfológico do colágeno e SHG. HE; 400x.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram anotados em fichas próprias para cada análise e, posteriormente, tratados por procedimentos estatísticos compatíveis com os objetivos propostos.

Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram utilizados para observar a homogeneidade de variância e distribuição dos dados, respectivamente. Para análise do tempo de cicatrização foi utilizado a técnica paramétrica *anova two-way*, com uso do teste de post-hoc (Tukey-Kramer para múltiplas comparações).

Para análise estatística da histologia foi utilizada a técnica paramétrica ANOVA *oneway com post hoc Tukey*.

Foi utilizado o programa Estadística 7 (*Statistica Release 7* - Statsoft Inc., Tulsa, Ok, USA) e o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação Macroscópica da Pele dos Ratos Submetidos a Várias Sessões

5.1.1 G1 (Uma sessão)

Neste grupo, os animais foram tratados com uma sessão de TFD. O processo de cicatrização foi avaliado e, após completo, foi realizada uma lesão com parâmetros padronizados com o laser de CO₂. Novamente, o processo de cicatrização da ferida, por ablação a laser, foi monitorado.

Os tempos individuais de cicatrização da lesão produto da TFD e da lesão com laser de CO₂, estão expostos na **Tabela 1**. No geral, o resultado da cicatrização da pele, após a TFD e a lesão, foi boa, o que se evidencia pelo resultado estético e pela ausência de complicações. Esses resultados apresentam uma semelhança no tempo de cicatrização de todos os animais deste grupo, comportamento que também foi observado no estudo piloto. Foi verificado um aumento no tempo da cicatrização da pele submetida ao Laser de CO₂ quando comparado ao da pele submetida à TFD. Esse resultado era esperado, pois o tempo de cicatrização após a ablação térmica, nos parâmetros empregados do laser, é superior, uma vez que o tecido carbonizado deve ser reabsorvido antes que anteriormente ao processo proliferativo da reparação.

O resultado da avaliação clínica do grupo está apresentada na **Tabela 2**. Todos os ratos apresentaram uma cicatrização completa, com fechamento da lesão e ausência de complicações. No rato G1a e G1e, uma leve hiperpigmentação foi identificada, e classificada como uma cruz entre quatro possíveis (+/4+) (**Figura 19**).

Tabela 1:Tempo de cicatrização(dias) da pele de cada rato submetida a uma primeira sessão no grupo G1.

Rato	Tempo em dias /1ª TFD	Tempo em dias/1ª Lesão
G1.a	16	18
G1.b	15	18
G1.c	15	18
G1.d	15	18
G1.e	14	18

Esta mudança cromática é provavelmente ocasionada pela atrofia epitelial, aumentando a visualização da matriz extracelular. No geral, o resultado da cicatrização da pele, após a TFD e a lesão, foi boa, o que se evidencia pelo resultado estético e pela ausência de complicações.

Tabela 2: Avaliação Clínica da pele dos ratos do Grupo G1 no fim da 1ª sessão. (0): ausência de características; (1+) até (4+): graus da apresentação das características.

Resultados Clínicos	G1a	G1b	G1c	G1d	G1e
Eritema Residual (_/4+)	0	0	0	0	0
Cicatriz Hipertrófica (_/4)	0	0	0	0	0
Cicatriz atrófica (_/4)	0	0	0	0	0
Cicatriz hipocrômica (_/4)	0	0	0	0	0
Cicatriz hiperocrômica (_/4)	1	0	0	0	1
Ulcera	0	0	0	0	0

1 Sessão

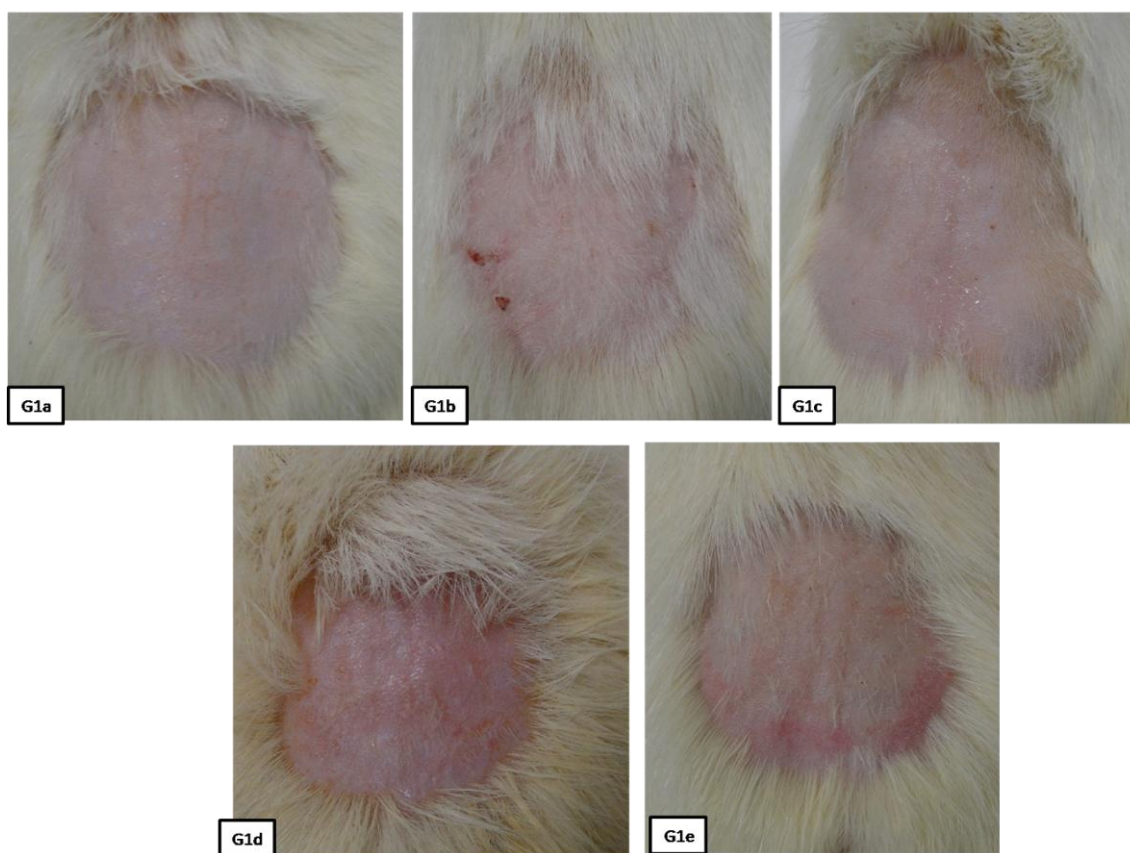


Figura 19:Pele cicatrizada após a primeira sessão.

5.1.2 G2 (Duas sessões)

Neste grupo, após a primeira sessão de TFD/lesão, os animais foram submetidos a uma segunda sessão de TFD/lesão, empregando os mesmos procedimentos feitos na primeira sessão. Foi contabilizado o tempo de cicatrização na primeira e na segunda sessão, após as diferentes lesões, cujos valores estão apresentados na **Tabela 3**.

Os tempos de cicatrização da primeira sessão foram semelhantes aos do grupo G1. Já na segunda sessão, foi observada uma diminuição no tempo de cicatrização da TFD e do tempo de cicatrização da lesão quando comparada ao resultado da primeira sessão. Uma hipótese para explicar este comportamento é o bom reparo tecidual originado da primeira sessão de TFD que favoreceu o reparo

dos traumas feitos na segunda sessão. Outro fator que pode ter contribuído para esse comportamento é a presença de um tecido novo, produto da cicatrização, que respondeu com maior rapidez a essa nova agressão. Na literatura científica, poucos trabalhos têm sido publicados estudando o reparo tecidual depois de múltiplas sessões de TFD; no entanto, estudos sobre a resposta da pele à TFD têm sido relatados. Segundo Choi e colaboradores (2010), num estudo feito em pele de rato, após 1 sessão de TFD, encontrou-se uma intensa estimulação molecular de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β -TNF α -) e proteases (MMPs) que resultou em estimulação epidérmica e dos componentes da derme, associados a uma melhoria na regeneração e remodelação da matriz dérmica, que por sua vez produz uma melhor resultado estético.

Tabela 3:Tempo de cicatrização (dias) da pele de rato submetida a duas sessões.

Rato	1ª SESSÃO		2ª SESSÃO	
	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)
	1ª TFD	1ª Lesão	2ª TFD	2ª Lesão
G2.a	14	18	7	15
G2.b	16	19	10	10
G2.c	15	18	11	14
G2.d	15	18	9	14
G2.e	15	18	10	13

Os resultados da avaliação clínica do grupo estão apresentados na **Tabela 4**. Todos os ratos mostraram uma cicatrização completa, com fechamento da lesão e ausência de processo infeccioso. No rato G2a foi evidenciada uma cicatriz atrófica, considerada como de 2+/4, que também foi apresentada no rato G2d e G2e – estas últimas com menor severidade, consideradas como 1+/4. A apresentação desta cicatriz é em formato linear, no mesmo local e com traçado semelhante ao da lesão provocada pelo laser de CO₂, o que sugere ser a ação do laser a provável causa do evento. A literatura também relata, como uma reação adversa do uso do CO₂, as

escoriações lineares e a cicatrizes produzidas após o uso deste laser ablativo (METELITSA; ALSTER, 2010), (COSTA et al., 2011). Portanto, um maior dano tecidual com perda de tecido parece favorecer a formação de cicatrizes atróficas.

Tabela 4: Avaliação Clínica da pele dos ratos do Grupo G2 no fim da 2ª sessão.(0): ausência de características; (1+) até (4+): graus da apresentação das características.

Resultados Clínicos	G2a	G2b	G2c	G2d	G2e
Eritema Residual (/4+)	0	0	0	0	0
Cicatriz Hipertrófica (/4)	0	0	0	0	0
Cicatriz atrófica (/4)	2	0	0	1	1
Cicatriz hipocrômica (/4)	1	0	2	1	1
Cicatriz hipertrófica (/4)	0	0	0	0	0
Ulcera	0	0	0	0	0

Alguns ratos deste grupo apresentaram hipocromia na pele cicatrizada, qualificada como G2c (2+/4), G1a, G1d, G1e (1+/4) e evidenciada na **Figura 20**. Este comportamento da pele pode ser resultado de um tecido não completamente reparado.

Quando comparado o resultado da cicatrização da pele para os procedimentos realizados em uma sessão ou duas sessões, a diferença estética é leve e o resultado estético é considerado satisfatório.

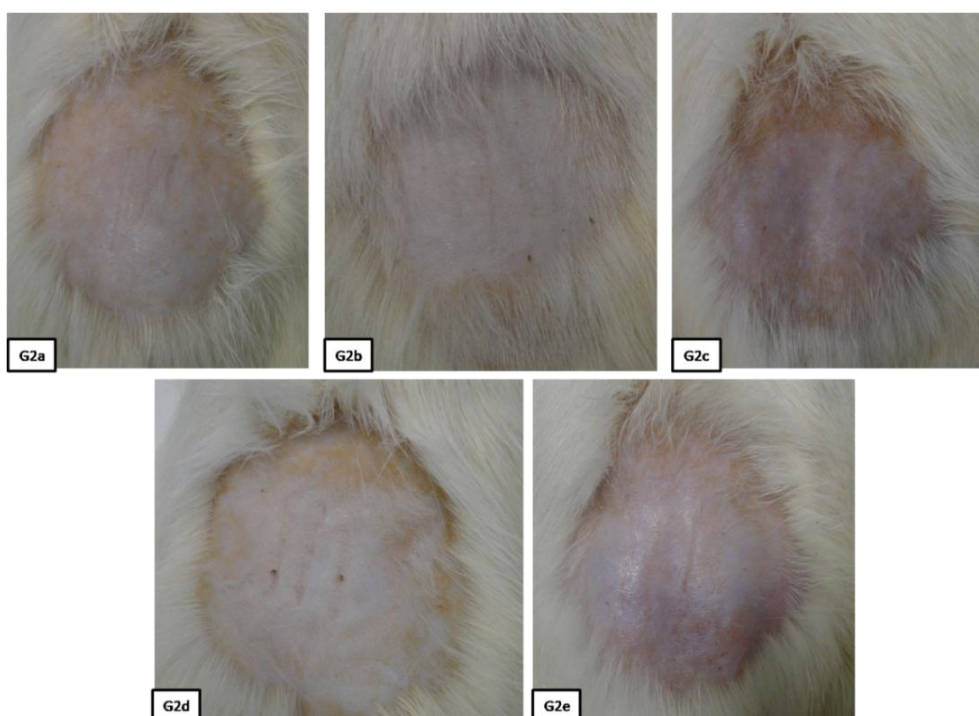


Figura 20: Pele cicatrizada após a segunda sessão.

5.1.3 G3 (Três sessões)

No grupo G3 a pele dos ratos passou por três sessões, sendo repetidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente para cada etapa. Os tempos individuais para cicatrização da lesão, produto da TFD e da lesão com o Laser de CO₂ são apresentados na **Tabela 5**.

Na primeira sessão os resultados são semelhantes aos outros grupos. Na segunda sessão, o tempo de cicatrização da TFD é pouco maior quando comparada com G2. Já na cicatrização da pele agredida com laser de CO₂ (terceira sessão) o tempo de cicatrização é maior do que o procedimento anterior (TFD), este último comportamento repetido em todos os grupos é mais notório nesta sessão. Uma possível explicação como mencionado anteriormente é a natureza ablativa e mais agressiva do procedimento que induz um maior tempo para cicatrização.

Neste grupo foi observado um acréscimo no tempo de reparo tecidual da segunda sessão para a terceira, associado à redução do resultado estético da pele

quando comparado aos grupos G1 e G2. Os ratos G3a e G3e apresentaram, em todas as sessões, um tempo maior de cicatrização para os dois procedimentos quando comparados aos animais do mesmo grupo. Esta demora indica uma maior dificuldade no reparo do tecido, que também é evidenciada pela piora no resultado estético. Este aumento do tempo possivelmente está relacionado com o trauma repetitivo gerado na pele do rato (procedimentos consecutivos), sendo esta condição fator predisponente para a cronicidade da cicatrização, por diminuição da capacidade de reparação tecidual, e que, por sua vez, influencia no resultado estético da cicatrização (ANDRADE; LIMA e ALBUQUERQUE, 2010).

O animal G3a teve um aumento do tempo de cicatrização em todas as sessões, quando comparado ao tempo de cicatrização dos animais do mesmo grupo. Depois de feita a lesão pelo laser de CO₂, na terceira sessão, a lesão provocada apresentou infecção, se tornando em úlcera e finalmente o animal evoluiu para óbito **Figura 21**. A infecção da área tratada após TFD é relatada na literatura como uma reação adversa pouco frequente, devido ao efeito antimicrobiano da TFD (IBBOTSON, 2011; JORI et al., 2006; MAISCH et al., 2004). Sem tratamento adequado, a presença da infecção pode predispor a pele à formação de úlcera e pobre cicatrização (STEED, 2003). Neste caso, o animal apresentou um trauma repetitivo, o que favoreceu uma cicatrização anormal, com possível perda de matriz extracelular e, por esta razão, um acometimento de maior profundidade da pele quando submetida a uma lesão (induzida da mesma forma que as anteriores). Estas situações todas levam a uma maior dificuldade no reparo tecidual, levando a uma cronificação do quadro e a uma possível propensão para a geração de úlceras e infecção da mesma. Dada a baixa probabilidade de infecção em aplicações de TFD, os animais do presente estudo não receberam nenhum tratamento antimicrobiano; portanto, o risco de infecção da ferida existia. Apesar disso, o quadro de infecção foi de fato observado em apenas um único rato em todo o estudo.

Tabela 5:Tempo de cicatrização (dias) da pele de rato submetida a três sessões.

Rato	1ª sessão		2ª sessão		3ª sessão	
	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)
	1ª TFD	1ª Lesão	2ª TFD	2ª Lesão	3ª TFD	3ª Lesão
G3.b	14	18	10	13	13	16
G3.c	13	18	10	13	11	17
G3d	15	17	7	13	12	17
G3.e	15	17	10	14	14	18
G3a	14	18	10	16	14	úlceras

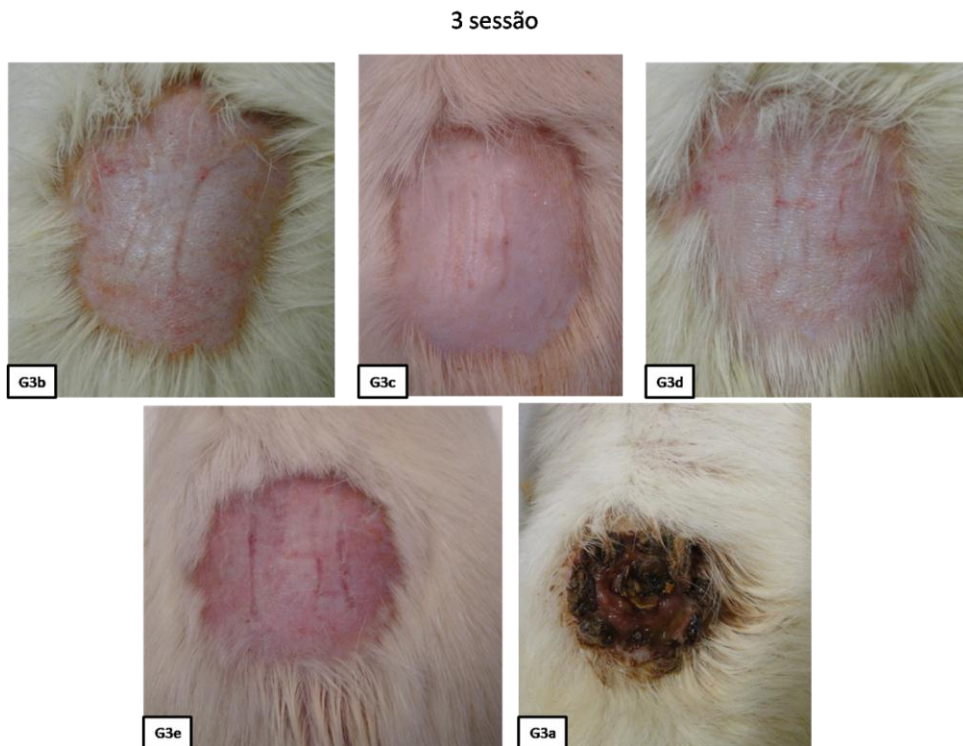


Figura 21: Pele cicatrizada após a terceira sessão.

Na **Tabela 6** estão apresentados os resultados clínicos da cicatrização da pele após da 3ª sessão. Foram evidenciadas cicatrizes atróficas mais visíveis quando comparadas aos animais dos grupos anteriores (**Figura 21**), fato provavelmente relacionado ao trauma repetitivo a que foi submetida a pele dos ratos. O animal G3b e G3d apresentaram hipocromia classificada como 2+/4 e 1+/4, respectivamente. Como dito anteriormente, esta hipocromia pode estar relacionada com um reparo não finalizado da pele.

Quando comparado o resultado da cicatrização da pele, nos procedimentos realizados nos três grupos (G1, G2 e G3) a diferença do resultado estético apresenta uma piora gradual, que fica especialmente evidente no local da cicatrização da lesão feita com laser de CO₂. Apesar disso, a cicatrização ainda é considerada satisfatória.

Tabela 6: Avaliação Clínica da pele dos ratos do Grupo G3 ao final da 3ª sessão. (0): ausência de características; (1+) até (4+): graus da apresentação das características

Resultados Clínicos	G3B	G3C	G3D	G3E	G3A
Eritema Residual (/4+)	0	0	0	0	Úlcera
Cicatriz Hipertrófica (/4)	0	0	0	0	Úlcera
Cicatriz atrófica (/4)	2	2	1	3	Úlcera
Cicatriz hipocrômica (/4)	2	0	1	0	Úlcera
Cicatriz hiperocrômica (/4)	0	0	0	0	Úlcera
Úlcera	0	0	0	0	Úlcera

5.1.4 G4 (Quatro sessões)

Neste grupo, cada um dos animais passou por quatro sessões (TFD/lesão), nas quais foram repetidos os mesmos procedimentos em cada uma delas.

Os tempos individuais para cicatrização da lesão, produto da TFD e da lesão com CO₂, estão apresentados na **Tabela 7**. Esses resultados apresentam tempos de

cicatrização para a primeira, segunda e terceira sessão semelhante aos dos grupos anteriores.

É evidente neste grupo o menor tempo de cicatrização em todas as sessões da TFD quando comparado com o tempo de cicatrização da lesão feita pelo laser que pode ser explicado pelo caráter ablativo da lesão feita pelo laser causando uma lesão mais severa com uma maior demora na cicatrização e também pode estar associado ao possível estímulo feito pela TFD favorecendo a proliferação celular e produção de colágeno e acelerando uma resposta de cicatrização completa (JAYASREE et al., 2001).

Tabela 7: Tempo de cicatrização (dias) da pele de rato submetida a quatro sessões.

Rato	1ª SESSÃO		2ª SESSÃO		3ª SESSÃO		4ª SESSÃO	
	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)	T. (dias)
	1ª TFD	1ª Lesão	2ª TFD	2ª Lesão	3ª TFD	3ª Lesão	4ª TFD	4ª Lesão
G4.b	14	17	9	13	8	15	13	17
G4.c	14	17	10	13	9	14	12	16
G4.d	15	18	8	18	8	16	13	18
G4.e	15	16	7	14	10	14	14	19

O resultado da avaliação clínica do grupo está apresentado na **Tabela 8**. Foram evidenciadas cicatrizes atróficas mais visíveis quando comparadas aos animais dos grupos anteriores (**Figura 22**), fato relacionado com o trauma repetitivo a que a pele dos ratos foi submetida.

Todos os ratos deste grupo apresentaram algum grau de atrofia, explicado pela lesão repetitiva a que foram submetidos. Só um rato (G4d) apresentou um cicatrização francamente atrófica, associada a hiper Cromia e evidência clara de cicatriz. Pode ser observado que a pele tratada mostra maior grau de atrofia no local

onde foi feita a lesão com o Laser de CO₂ que leva a hipotetizar que esta resposta estética é possivelmente devida, ao dano causado pelas repetidas sessões, especialmente à ação do laser de CO₂.

Tabela 8: Avaliação Clínica da pele dos ratos do Grupo G4 ao final da 4ª sessão. (0): ausência de características; (1+) até (4+): graus da apresentação das características

Resultados Clínicos	G4b	G4c	G4d	G4e	Morte
Eritema Residual (/4+)	0	0	1	0	Morte
Cicatriz Hipertrófica (/4)	0	0	0	0	Morte
Cicatriz atrófica (/4)	2	2	2	2	Morte
Cicatriz hipocrômica (/4)	0	0	0	0	Morte
Cicatriz hiperocrômica (/4)	0	1	3	1	Morte
Úlcera	0	0	0	0	Morte

O rato G4a foi a óbito após a aplicação da anestesia antes da terceira TFD. Para manter os ratos anestesiados durante o processo da TFD, foi necessário o incremento das doses de anestésico até a aplicação de overdose, resultado na resistência dos receptores ao medicamento.

Os tempos de cicatrização dos diferentes grupos neste estudo podem ser visualizados na **Figura 23** e na **Tabela 9**. Foi observado um menor tempo de cicatrização da lesão após TFD quando comparada com as lesões com Laser de CO₂ em todas as sessões, apresentado diferenças significativas entre os tempos de cicatrização para todas as sessões ($p < 0,05$). Este fato pode ser explicado como mencionado anteriormente pela diferente natureza da lesão que, para o Laser de CO₂, é mais severa. Também tem sido publicado na literatura científica o efeito positivo da TFD sobre a cicatrização das lesões, intervindo em todas as fases do processo de reparação (inflamação, proliferação e remodelação) (GARCIA et al., 2010; JAYASREE et al., 2001; LIAPINA et al., 2010; SILVA et al., 2004), e acelerando o processo de renovação do epitélio, este estímulo induzido, sobre

citocinas tais como IL-1, TGF- β e TNF- α , em MMP e outras substâncias pró-inflamatórias (CHOI et al., 2010).

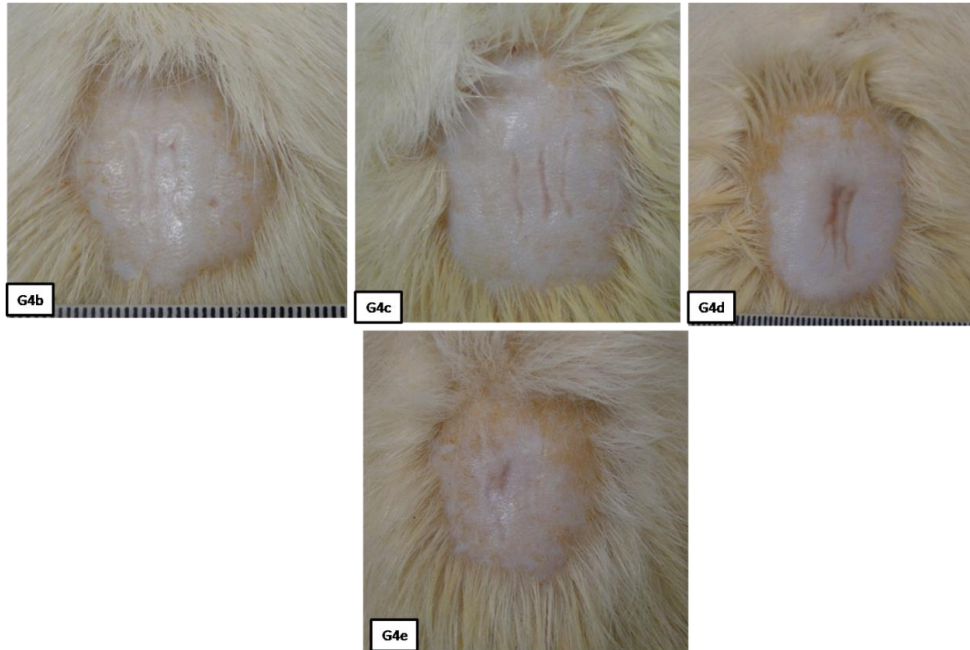


Figura 22: Pele cicatrizada após a quarta sessão.

Quando comparado o tempo de cicatrização da TFD na primeira sessão (G1) com as outras sessões foi significativamente maior para a primeira sessão (G2, $p=0,001$; G3, $p=0,05$; G4, $p=0,05$). Resultado este, que pode ser associado a um estímulo positivo da TFD, que teria “preparado” a pele para responder favoravelmente ao reparo dos traumas feitos nas outras sessões. Outro fator que beneficiou este comportamento foi a presença de um tecido novo, produto da cicatrização, que respondeu com maior rapidez a essa nova agressão. Comparando o tempo de cicatrização da TFD da segunda sessão com as outras foi significativamente menor para a segunda sessão (G3, $p=0,01$ G4, $p=0,05$), que nos leva a pensar que essa “preparação” do tecido pela TFD para responder rapidamente a outros traumas diminui quando submetida a pele a múltiplas agressões consecutivas.

Foi evidente que a 4ª sessão realizada no grupo G4 apresentou um resultado estético inferior, quando comparado aos demais grupos, mostrando o dano causado pelos procedimentos na pele. Por um lado, é importante considerar que os procedimentos foram feitos consecutivamente, tendo como base a avaliação macroscópica da lesão para sinalar a pele como cicatrizada. Isso pode ter levado a indução de novas lesões em tecido ainda não totalmente reparados histologicamente, uma vez que, neste caso, 5 a restauração total ou terceira fase da cicatrização (remodelagem) da pele teria sido impedida. Esta fase da cicatrização é importante, pois é nela onde o colágeno tipo III, que pode se apresentar em maior quantidade na lesão recém reparada, é substituído pelo colágeno tipo I, e desta forma conceder maior estabilidade e resistência mecânica à pele (STADELMANN; DIGENIS e TOBIN, 1998). Por outro lado, é possível pensar em uma resposta subnormal da cicatrização por parte do tecido, como consequência dos traumas repetitivos, com propensão a apresentação de tecido fibrótico.

Tabela 9: Valores de média, desvio padrão e resultados estatísticos do tempo de cicatrização da TFD e a Lesão nos diferentes grupos.

	G1	G2	G3	G4
Tempo da Cicatrização -TFD (Dias)	15±0,7*	9,4±1,5 ^a	12,8±1,3 ^{ab}	13±1,3 ^{ab}
Tempo de cicatrização - lesão (Dias)	18±0*	13,2±1,9 ^c	17±0,8 ^d	17,5±1,3 ^d

*Diferença significativa intragrupo (TFD vs Lesão), p <0,05

^aDiferença significativa intergrupo (TFD: G1xG2, G1xG3,G1xG4), p<0,05

^bDiferença significativa intergrupo (TFD:G2xG3, G2xG4), p<0,05

^cDiferença significativa intergrupo (Lesão: G1xG2), p<0,05

^dDiferença significativa intergrupo (Lesão: G2xG3,G2xG4), p<0,05

Tempo de cicatrização da pele submetida a múltiplas sessões

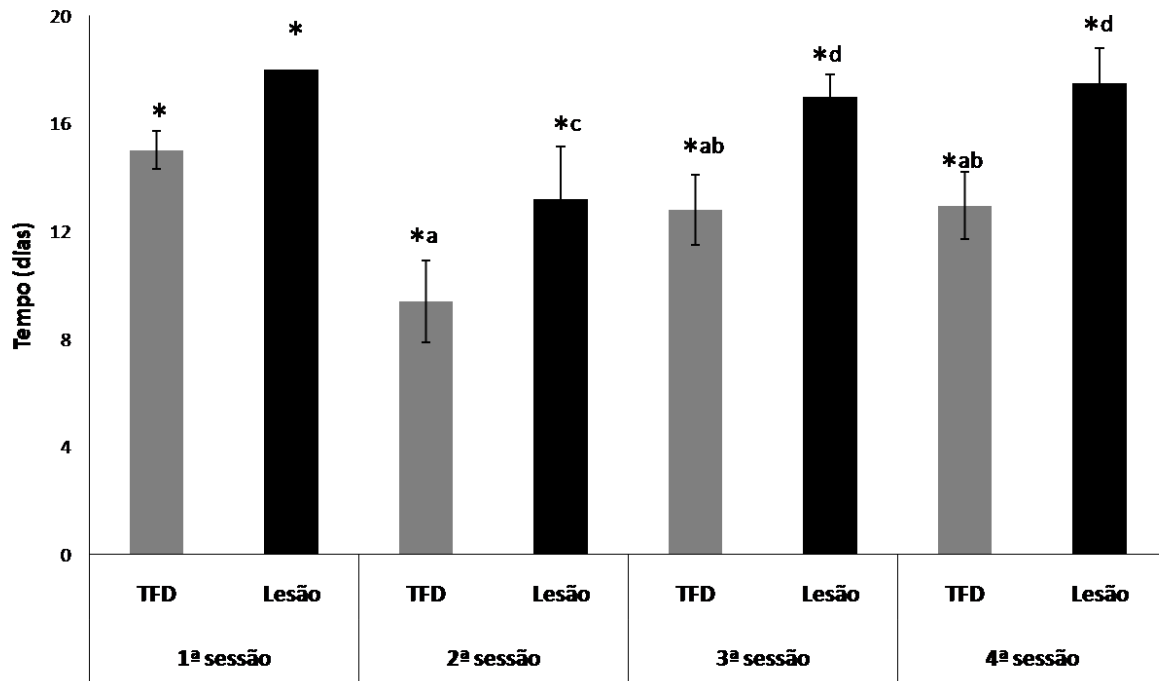


Figura 23: Gráfico que representa os diferentes tempos de cicatrização. (*)Diferencia significativa intragrupo (TFD vs Lesão), $p < 0,05$; (ª)Diferença significativa intergrupo (TFD: G1xG2, G1xG3, G1xG4), $p < 0,05$; (º)Diferença significativa intergrupo (TFD: G2xG3, G2xG4), $p < 0,05$; (º) Diferença significativa intergrupo (Lesão: G1xG2), $p < 0,05$; (º)Diferença significativa intergrupo (Lesão: G2xG3, G2xG4), $p < 0,05$.

Na **Figura 24**, uma comparação gráfica do resultado estético da pele após cada sessão é apresentada. Entre os dois primeiros grupos, o resultado estético apresenta diferenças leves quando comparado ao grupo com pele sadia, enquanto o grupo 3 e 4 apresentam sinais clínicos mais evidentes e intensos. Ainda assim, foi evidenciada completa cicatrização das feridas em todos os grupos, e a resposta do tecido que foi submetido a múltiplas sessões de TFD alcançou um grau de cicatrização satisfatório, na maioria dos casos. É importante, uma vez mais, levar em conta que a pele foi submetida a TFD/lesões recorrentes e contínuas sem aguardar o tempo necessário para que a terceira etapa da reparação (remodelagem) ocorresse, situação que pode ter interferido nos resultados obtidos. Essa situação deve ser considerada quando do uso de múltiplas sessões de TFD, especialmente em regiões de comprometimento estético.

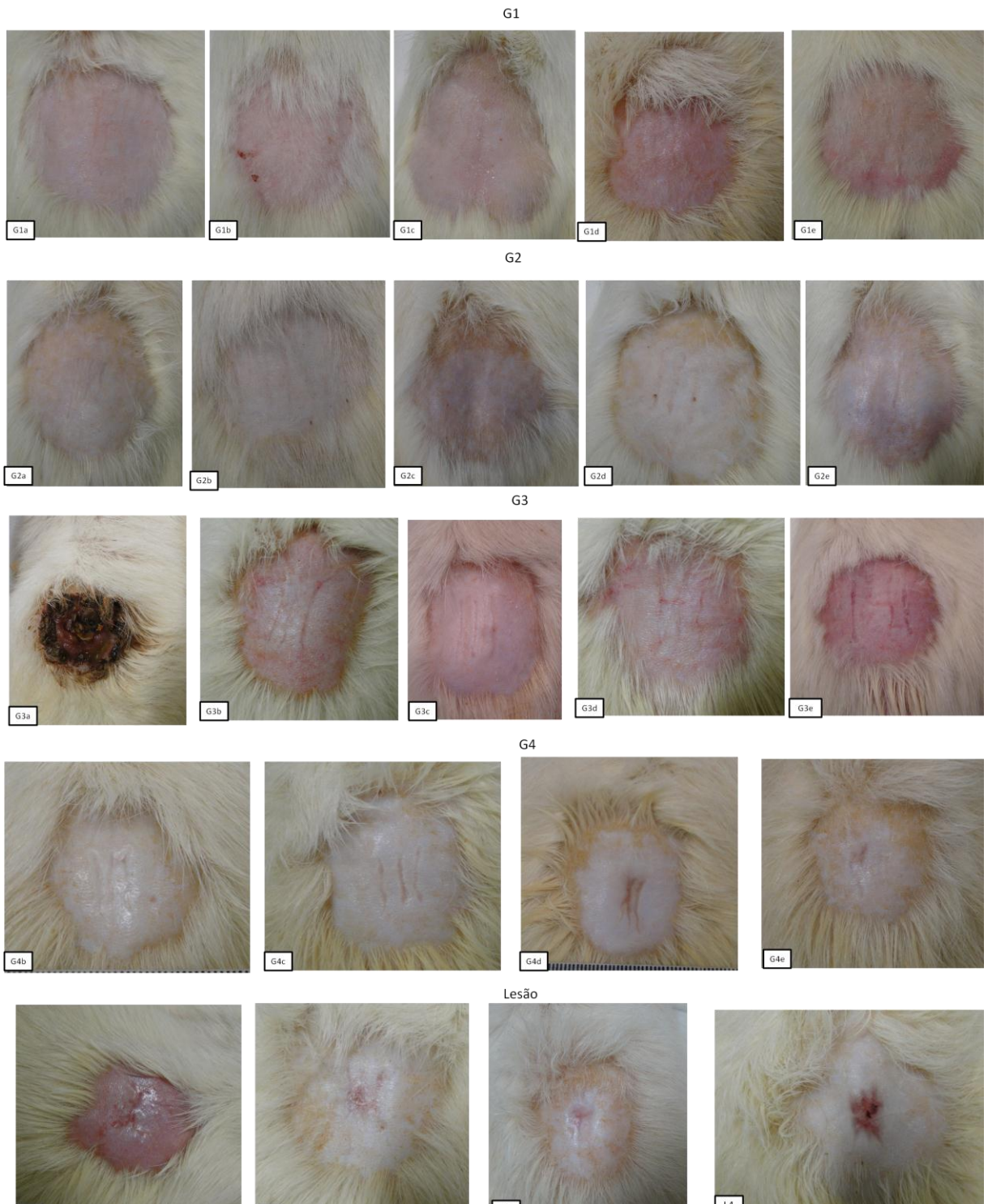


Figura 24: Representação iconográfica do resultado final da pele tratada com TFD e submetida à lesão. Comparação do resultado macroscópico dos grupos G1, G2, G3, G4.

5.2 Estudo Microscópico

5.2.1 Glândulas sebáceas

Neste estudo foram quantificadas as glândulas sebáceas (por mm²) nas lâminas histológicas em todos os grupos. A **Figura 26** apresenta as fotomicrografias de lâminas coradas com Verhoff. A cor rosa representa o colágeno da derme, e a cor amarela, estruturas celulares (queratinócitos presentes na epiderme e glândulas sebáceas e folículos pilosos presentes na derme). Os campos observados e fotografados dos animais G0c, G1a, G2c, G3d, apresentaram uma quantidade semelhante de glândulas sebáceas quando comparados ao controle (G0). No animal G4d, foi evidenciada uma fibrose moderada, evidenciada pela disposição paralela e densidade aumentada das fibras de colágeno observadas, que foi associada a intensa redução no número de glândulas sebáceas e folículos pilosos. Estas alterações, por sua vez, podem estar associadas aos danos consecutivos a que a pele foi submetida (o que estimulou a formação de tecido de cicatrização anormal, fibrótico), e ao dano ablativo do laser de CO₂, que produziu uma perda importante de tecido e um acometimento das estruturas internas da pele. Contudo, é importante mencionar que as glândulas sebáceas são alvos da ação da TFD, o que fica mais evidente quando realizadas múltiplas sessões (POLLOCK et al., 2004). É esta a razão de ser utilizada esta técnica para tratamento da acne. Para esta doença, é possível que o mecanismo de ação se dê pela destruição do *P. acnes*, diminuição da secreção de sebo causada pelo fotodano e melhoria na obstrução folicular (HONGCHARU et al., 2000; POLLOCK et al., 2004). No entanto, de acordo com Divaris et al. (1990) num estudo em modelo animal, foi evidenciado acúmulo da PpIX nas glândulas sebáceas e nos folículos pilosos, com diminuição destas estruturas quando avaliada a pele após 55 dias.

Em nosso trabalho, depois de contabilizadas estas estruturas (em 50 lâminas) foi observada em meia quantidades semelhantes de glândulas sebáceas quando comparadas com o grupo controle em todas as sessões como apresenta a figura **Figura 25**. No grupo G4 após 4 sessões um de seus integrantes apresentou uma

redução destas estruturas, que parece diretamente relacionada com uma cicatrização anormal **Figura 26**.

A tabela **Tabela 10**, mostra as médias e desvios padrão das glândulas quantificadas por mm^2 , não se encontrando diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 10: Valores de média, desvio padrão e resultados estatísticos da quantidade de glândulas/ mm^2 . Não apresenta significância estatística intergrupo.

	G1	G2	G3	G4
Quantidade de glândulas/ mm^2 -TFD	3,99±0	4,04±1	3,94±1	3,92±1

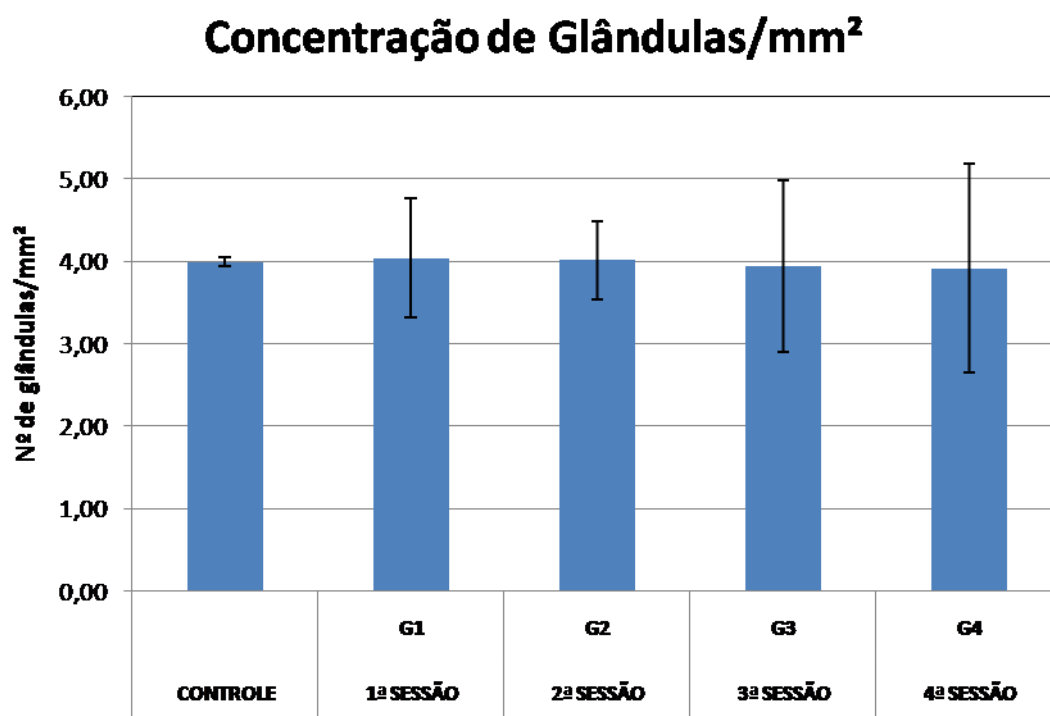


Figura 25: Representação gráfica das médias aritméticas da concentração de glândulas/ mm^2 . Não apresentou diferença estatística intergrupo.

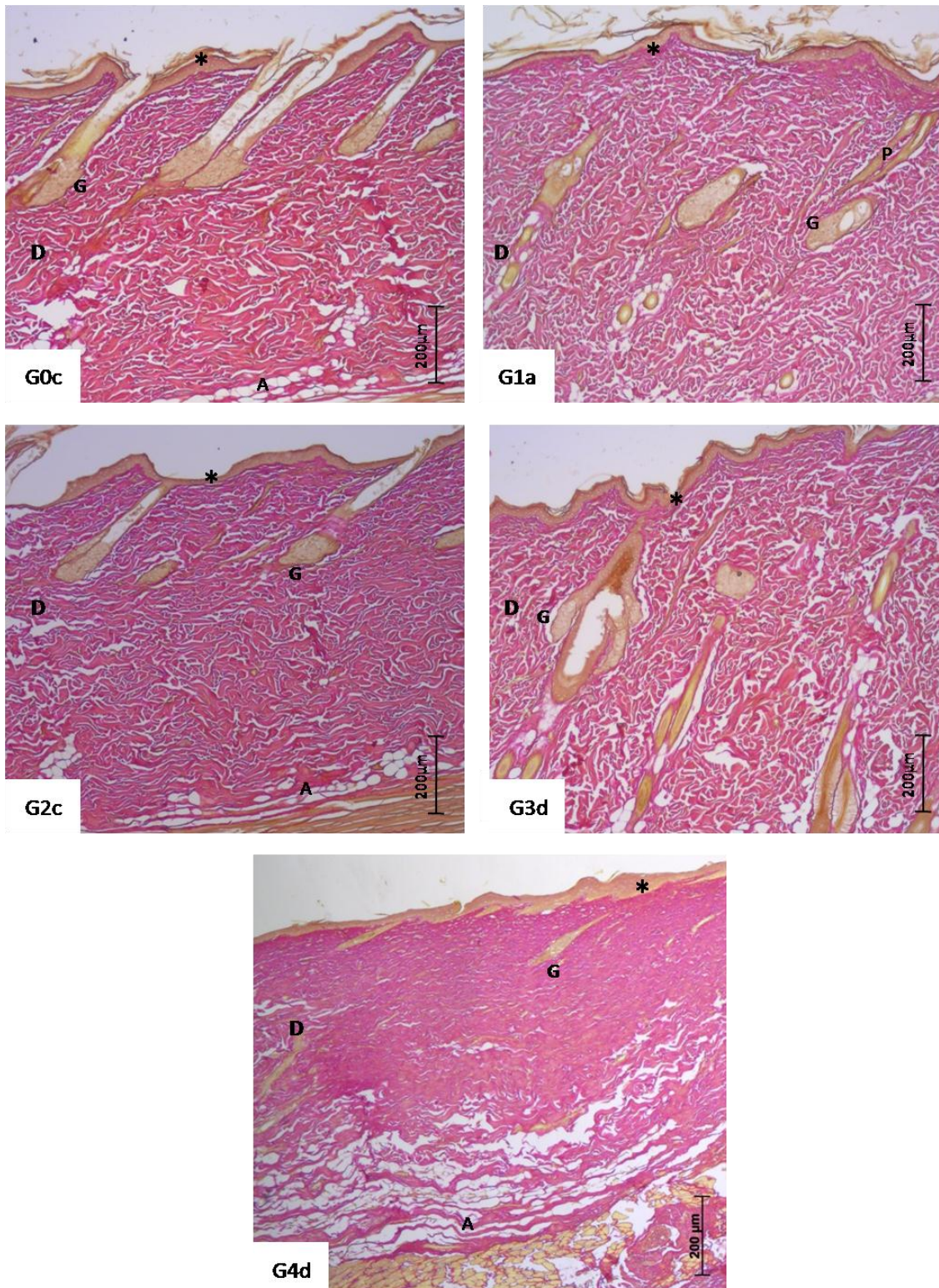


Figura 26: Fotomicrografias demonstrando a derme e epiderme, camadas do tegumento e as unidades pilossebáceas, compostas do folículo piloso e da glândula sebácea: Epiderme (*);Derme (D); hipoderme com células adiposas (A). Note-se a diminuição de glândulas sebáceas, associada à fibrose do tecido. [Verhoff; 50x].

5.2.2 Fibroblastos nas camadas dérmicas

Foram quantificados os fibroblastos tanto da camada papilar como reticular, cujos resultados estão representados na **Figura 27** e **Tabela 11**.

Tabela 11: Valores da média, desvio padrão e resultados estatísticos da quantidade de fibroblastos em cada camada.

Grupo	G0		G1		G2		G3		G4	
Derme	Derme Papilar	Derme Reticular	Derme Papilar	Derme reticular	Derme Papilar	Derme Reticular	Derme Papilar	Derme reticular	Derme Papilar	Derme reticular
Contagem de										
Fibroblastos	118±11,5*	88±7 ^b	120±22*	82±8,7 ^b	110±24*	95±18 ^b	97±18*	81±13 ^b	180±1*5	140±12 ^b

*Diferença significativa intergrupo-camada papilar (G4vs G0,G1,G2,G3), p <0,05

^bDiferença significativa intergrupo-camada reticular (G4 vs G0, G1, G2, G3), p<0,05

Pode-se observar que para os grupos G1,G2,G3 na camada papilar da derme, a quantidade média de fibroblastos observada é muito semelhante à do grupo controle (G0). Já para o grupo G4 apresenta-se um aumento significativo tanto na camada papilar como reticular. Na derme reticular ou profunda, é evidente uma diminuição da quantidade de fibroblastos quando comparada à derme papilar, com aumento desses valores no grupo G4.

Esses resultados apresentaram um aumento dos fibroblastos tanto na derme papilar como na reticular no grupo que passou por 4 sessões. Na camada papilar, o incremento dos fibroblastos foi maior pelo possível dano repetitivo, que estimulou a maior migração de fibroblastos com possível produção de tecido fibroso e que pode estar associado também a uma reparação ainda imatura neste local.

Na derme reticular, quando comparada com a papilar, o aumento dos fibroblastos é menor, devido possivelmente, ao menor dano a que foi submetido este tecido, pois a agressão atingia com maior severidade apenas a camada externa.

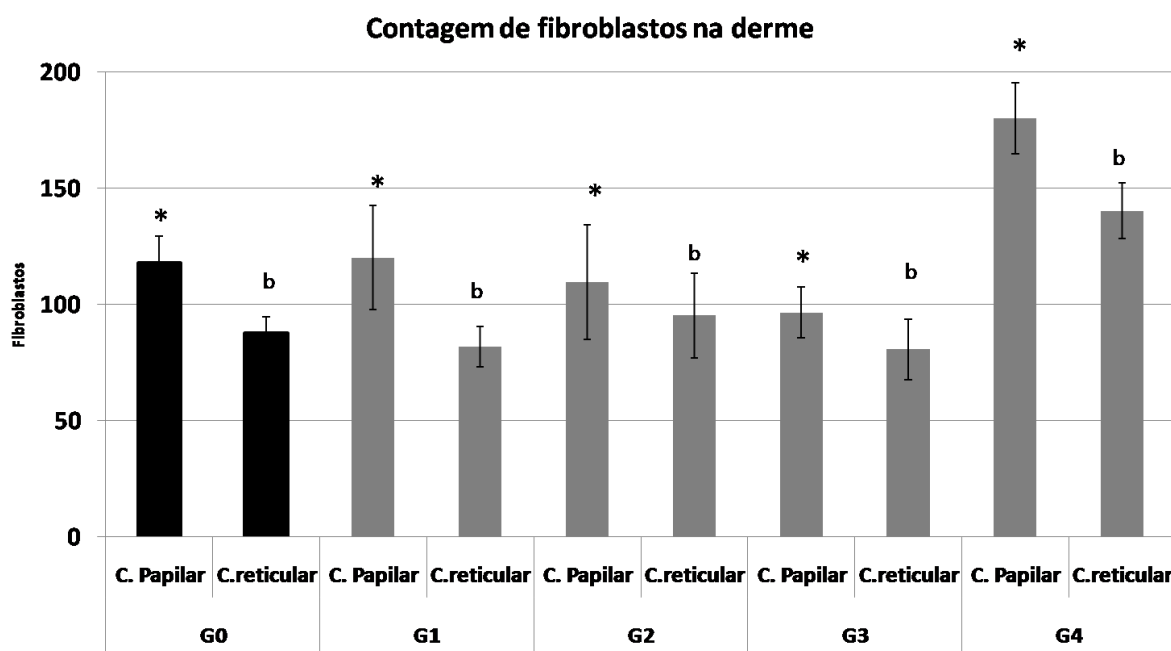


Figura 27: Representação da quantidade de fibroblastos encontrada na derme; as barras pretas representam o grupo controle. (*)Diferença significativa intergrupo- camada papilar (G4 vs G0,G1,G2,G3), $p < 0,05$

^b Diferença significativa intergrupo camada reticular (G4 vs G0, G1, G2, G3), $p < 0,05$

Em cicatrizes hipertróficas pode-se apresentar uma mudança na orientação e disposição das fibras de colágeno com aumento das células como fibroblastos (RAHBAN; GARNER, 2003), não entanto, é importante ter em conta o pouco tempo transcorrido entre acometimento da lesão e o estudo da peça.

5.2.3 Estudo qualitativo da fluorescência do colágeno

Foi feito um estudo qualitativo das lâminas histológicas coradas com HE, usando fluorescência por absorção de dois fótons no microscópio confocal, com avaliação da morfologia das fibras de colágeno (a cor das fotos neste estudo não apresenta interesse) e a geração do segundo harmônico (SHG). A lâmina foi avaliada tanto na derme papilar como na reticular. A **Figura 28** apresenta fotomicrografias das fibras colágenas, sendo avaliada a morfologia das fibras de todos os grupos na derme reticular. O grupo controle mostra fibras espessas, onduladas e densas, características também apresentadas nos grupos G1 e G2. Já em G3, é possível perceber algumas fibras de menor espessura quando comparadas com as do grupo

controle. As fibras de colágeno no grupo G4, por sua vez, são delgadas, perdendo a disposição ondulada e tornando-se paralelas e menos densas.

Figura 29, notou-se na derme papilar dos grupos G0,G1 e G2 uma apresentação de fibras colágenas espessas, densas e com uma disposição ondulada característica. Já nos grupos G3 e G4, outro padrão é apresentado: as fibras são paralelas (o que é evidentes especialmente em G4), finas e menos densas. Quando comparadas as fotomicrografias de G4 derme reticular vs derme papilar é apresentado uma maior diferencia morfológica das fibras na derme papilar, que sugere que esta camada suporta maior grau de injúria, por sua localização mais superficial.

Estas mudanças, acentuadas no grupo G3 e G4 mostram que os efeitos da TFD e da lesão na pele, quando induzidos consecutivamente, modificam a morfologia das fibras colágenas. Esses achados podem ser devidos a um processo de cicatrização incompleto, com presença de fibras do colágeno jovens. Segundo Monaco (2003), a pele sintetiza fibras de colágeno de menor tamanho e com uma disposição diferente como resposta aguda à injúria, com o objetivo de fechar a ferida. Posteriormente, estas fibras vão ser modificadas na etapa de remodelação da cicatrização.

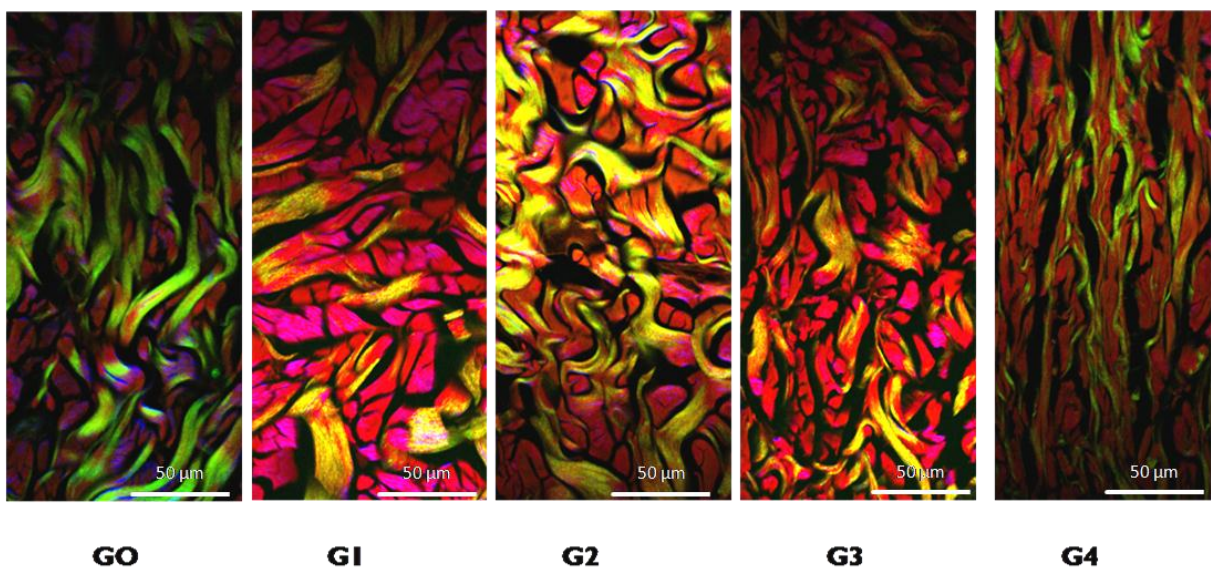


Figura 28: Derme Reticular. Fotomicrografias da fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x).

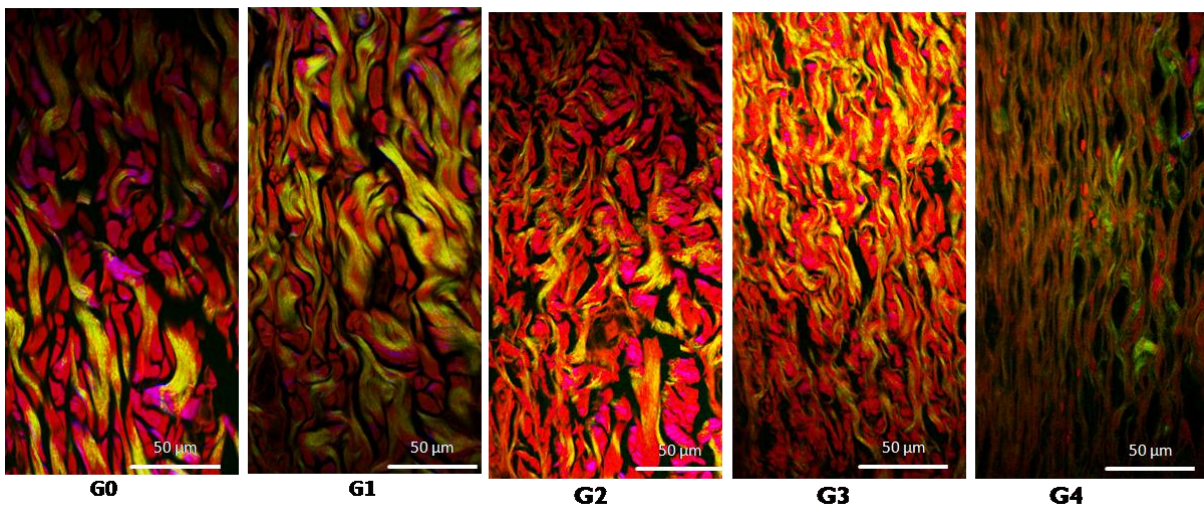


Figura 29: Derme Papilar. Fotomicrografias da fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x).

É importante considerar que esta morfologia e disposição anormal das fibras de colágeno também podem ser apresentadas em lesões fibróticas (RAHBAN; GARNER, 2003). Num estudo feito com microscópio multifótons para estudo de pele *ex vivo* – obtida de pacientes que se submeteram a cirurgia estética para o tratamento das cicatrizes hipertróficas – foram encontradas fibras colágenas fibrilares (delgadas), com disposição paralela em toda a profundidade do corte (CHEN et al., 2009) e com redução da luz gerada pelo segundo harmônico. Embora a morfologia seja muito parecida, não se pode afirmar nem descartar esta alteração da cicatrização em nosso estudo, uma vez que a cicatrização das lesões pode ser incompleta e ainda imatura, conforme já discutido.

5.2.4 Geração do segundo harmônico (SHG)

As fibras do colágeno podem se dividir em vários tipos, segundo a função que cumpram e o local que estejam localizadas. Na pele, são mais abundantes os colágenos tipo I e III, sendo o primeiro encontrado em maior proporção quando comparado com o segundo (STADELMANN; DIGENIS e TOBIN, 1998). Devido a sua estrutura de tripla hélice helicoidal não centro-simétrica (envelopada a direita), o colágeno tipo I tem a capacidade de geração de segundo harmônico (LV et al., 2012).

Neste estudo, foram avaliadas as lâminas de cada grupo, como apresentam a **Figura 30**, **Figura 31**. Na derme reticular, foi observado que grande parte do

colágeno total é composta de colágeno tipo I, visualizado nas fotomicrografias pela cor azul. Na avaliação da derme papilar (**Figura 31**), também é evidenciado que grande parte do colágeno observado por fluorescência é do tipo I.

Segundo Stadelmann (1998) a pele normal apresenta uma maior quantidade de colágeno tipo I numa proporção de 4:1; em lesões hipertróficas e cicatrizes imaturas o colágeno tipo III pode aumentar para até 33% do colágeno total, alterando a proporção entre colágeno tipo I e III para 2:1.

No estudo feito por Chen e colaboradores (2009), comparando cicatriz hipertrófica e pele normal, encontrou-se uma diminuição da emissão do segundo harmônico nas lesões hipertróficas associadas a outras modificações morfológicas das fibras de colágeno. Embora nosso estudo apresente fibras de colágeno compatíveis com cicatrização anormal, é necessário considerar que o processo de cicatrização ainda possa ser imaturo, e que esses achados podem estar relacionados com esse fato, por outro lado a SHG não apresentou diminuição significativamente visíveis.

Num estudo pré-liminar (apêndice II) feito em modelo animal e usando os mesmos parâmetros de lesão com laser de CO₂, na pele do rato, sem previa TFD foi evidenciado um maior dano da pele com um resultado estético inferior e uma maior diferença microestrutural das fibras de colágeno tanto na camada papilar como reticular com diminuição visível da SGH especialmente, no rato submetido a 4 sessões **Figura 38, Figura 39, Figura 40, Figura 41**. Essas diferenças podem estar relacionadas pela ausência do estímulo molecular, celular e tecidual da TFD sobre o tecido (CHOI et al., 2010), contudo, maiores estudos precisam ser realizados para confirmação da hipótese.

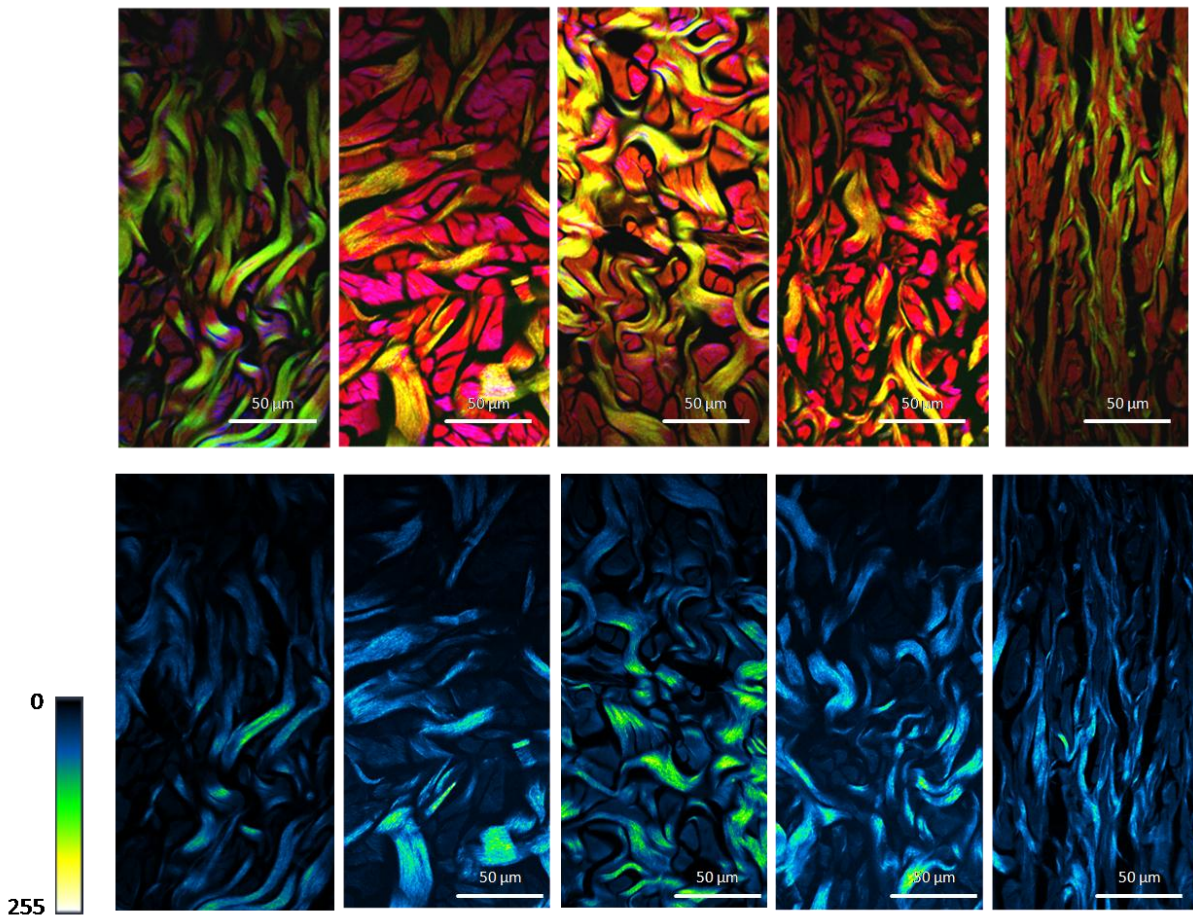


Figura 30: Derme reticular. Imagens representativas da geração de segundo harmônico (cor azul) e fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x)

Num estudo feito por Lv (2012) em modelo animal *in vivo* – depois de realizada a TFD na pele, com dose de 1,2 J/cm² em múltiplas sessões, e avaliada a pele depois de doze semanas do tratamento – houve um incremento significativo da geração de segundo harmônico quando comparada à pele sem tratamento. Nosso estudo apresentou dados diferentes, que podem ser explicados por vários fatores: a dose de TFD aplicada foi muito maior; o estudo pós-tratamento do colágeno, que demonstrou diferença significativa, foi realizado após 12 semanas da irradiação, enquanto o nosso foi avaliado depois de 15 a 20 dias da irradiação; e no estudo citado foi feito só TFD, em nosso estudo além de 1 a 4 sessões de TFD foi realizado de 1 a 4 lesões extras. Desta forma neste estudo, a pele submetida à TFD e a repetitivas agressões externas apresenta modificações na morfologia das fibras de

colágeno sem apresentar diminuição significativa do colágeno tipo I até 4 sessões consecutivas.

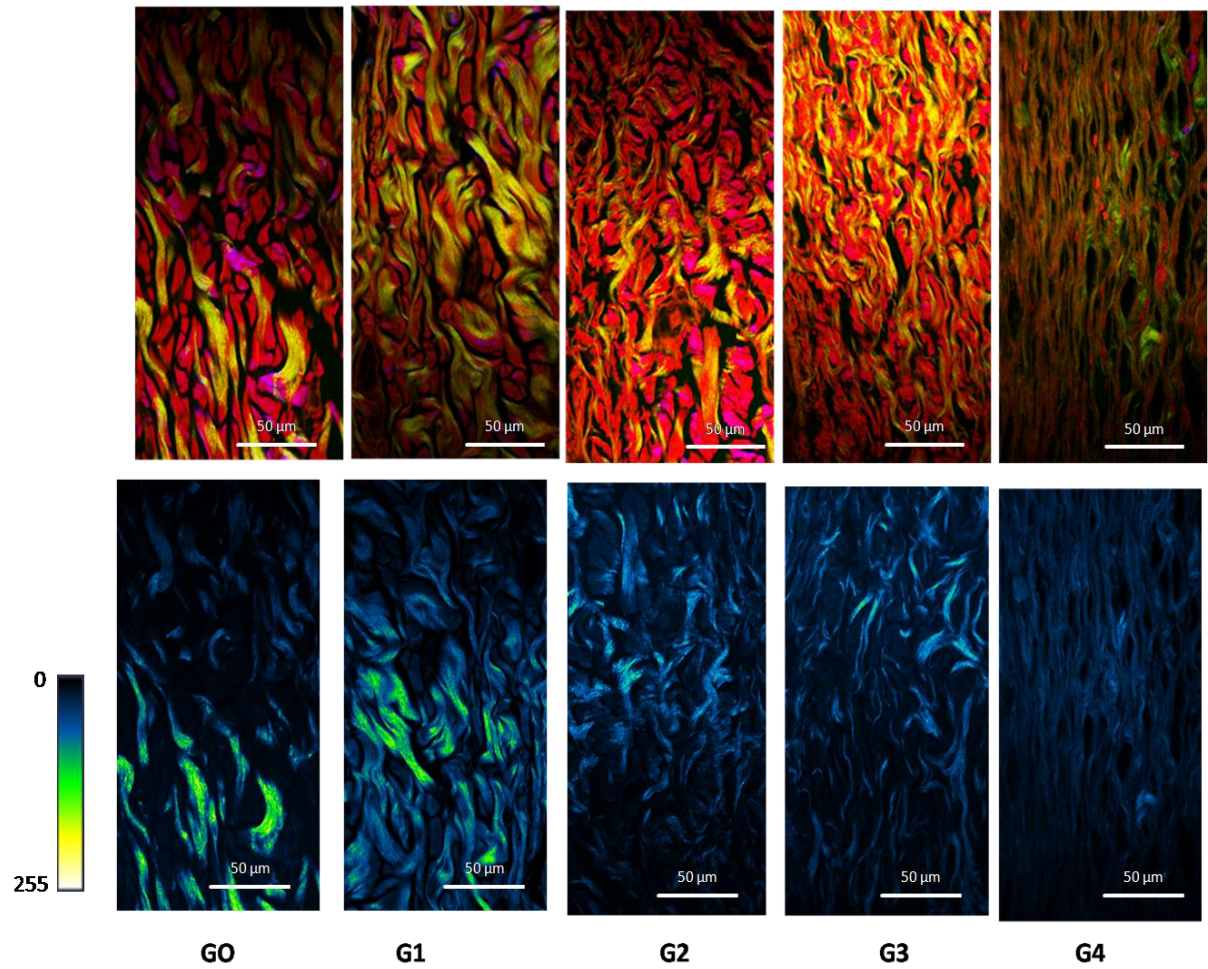


Figura 31: Derme papilar. Imagens representativas da geração de segundo harmônico (cor azul) e fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x)

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho percebe-se uma diminuição no resultado estético da cicatrização da pele quando avaliada macroscopicamente e submetida a 4 sessões de TFD/lesão consecutivas.

Os tempos de reparação do tecido incrementam-se paulatinamente depois da segunda sessão de TFD/lesão.

Foi evidenciado conservação da quantidade de glândulas sebáceas até depois de 4 sessões com exceção de 1 rato do grupo G4 que apresentou diminuição das mesmas quando associado a atrofia.

Modificações na morfologia das fibras de colágeno são mais evidentes na pele cicatrizadas após 4 sessões de TFD/Lesão. Não entanto, a SHG foi conservada nestas lâminas.

A partir destes dados sugere-se que a cicatrização na pele após 4 sessões de TFD/lesão, apresenta modificações no resultado estético, histológico, da morfologia das fibras de colágeno que podem estar relacionadas com acometimento consecutivo da pele em 8 ocasiões e com uma cicatrização incompleta entre elas.

7. REFERÊNCIAS

ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.74, n.5, p.656-69, 2001.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin**, v.61, n.4, p.250-81, 2011.

ALLISON, R.R.; MOTA, H.C.; SIBATA, C.H. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p.263-277, 2004.

ANDRADE, A.; LIMA, G.C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras.**, v.9, n.1, p.21-30, 2010.

BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology--an update. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.21, n.3, p.142-9, 2005.

BAGNATO, V.S. **Novas técnicas óticas**, Livraria da Física, São Paulo, Brazil 2008.

BAGNATO, V.S., et al. PDT experience in Brazil: A regional profile, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2, n.2, p. Pages 107-118, 2005.

BASSET-SEGUIN, N. et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. **Eur J Dermatol**, v.18, n.5, p.547-53, 2008.

BROUGHTON, G., 2ND; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7 Suppl, p.1e-S-32e-S, 2006.

BROUWER, P.A. et al. Effect of Photodynamic Therapy on the Mechanical Strength of Healed Rodent Skin Incisions. **Lasers Med Sci**, v.15, p.31-34, 2000.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.21, n.3, p.293-302, 2007a.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.21, n.4, p.439-51, 2007b.

CHEN, A.C. et al. Second harmonic generation and multiphoton microscopic detection of collagen without the need for species specific antibodies. **Burns**, v.37, n.6, p.1001-9, 2011.

CHEN, G. et al. Nonlinear spectral imaging of human hypertrophic scar based on two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation. **Br J Dermatol**, v.161, n.1, p.48-55, 2009.

CHOI, J.Y. et al. Molecular changes following topical photodynamic therapy using methyl aminolaevulinate in mouse skin. **J Dermatol Sci**, v.58, n.3, p.198-203, 2010.

COSTA, F., B et al. Complications in laser dermatologic surgery. Part II: fractional and non-fractional ablative laser and fractional non-ablative laser. **Surg Cosmet Dermatol**, v.3, n.2, p.135-46, 2011.

DANIELL, M.D.; HILL, J.S. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg**, v.61, n.5, p.340-8, 1991.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, v.9, p.283-9, 2004.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst**, v.90, n.12, p.889-905, 1998.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res**, v.38, n.8, p.2628-35, 1978.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, v.127, n.3, p.514-25, 2007.

FANTINI, F. et al. Pathologic changes after photodynamic therapy for Basal cell carcinoma and Bowen disease: a histologic and immunohistochemical investigation. **Arch Dermatol**, v.144, n.2, p.186-94, 2008.

FARRAR, M.D. et al. **Photodynamic therapy modulates production of transforming growth factor (TGF)-b in association with improved healing in excisional wounds of human skin.** In: B.J.o. Dermatology (Editor), British Society for Investigative Dermatology Annual Meeting 2011.

FINGAR, V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. **J Clin Laser Med Surg**, v.14, n.5, p.323-8, 1996.

FREITAS, I.; BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, v.11, n.1, p.3-30, 1991.

GARCIA, V.G. et al. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. **Lasers Med Sci**, v.25, n.2, p.221-8, 2010.

GURTNER, G.C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n.7193, p.314-21, 2008.

HAMBLIN, M.R. et al. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. **Photochem Photobiol**, v.75, n.1, p.51-7, 2002.

HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **J Invest Dermatol**, v.115, n.2, p.183-92, 2000.

IBBOTSON, S.H. Adverse effects of topical photodynamic therapy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.27, n.3, p.116-30, 2011.

JAYASREE, R.S. et al. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **J Biomater Appl**, v.15, n.3, p.176-86, 2001.

JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med**, v.38, n.5, p.468-81, 2006.

KARRER, S. et al. Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v.120, n.2, p.325-31, 2003.

KARUKONDA, S.R. et al. The effects of drugs on wound healing: part 1. **Int J Dermatol**, v.39, n.4, p.250-7, 2000.

KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H.; PROSS, D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B**, v.6, n.1-2, p.143-8, 1990.

KOHL, E.; KARRER, S. Photodynamic therapy for photorejuvenation and non-oncologic indications: overview and update. **G Ital Dermatol Venereol**, v.146, n.6, p.473-85, 2011.

LEHMANN, P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. **Br J Dermatol**, v.156, n.5, p.793-801, 2007.

LIAPINA, E.A. et al. [Effect of the photosensitizers pheophorbid a and protoporphyrin IX on skin wound healing by the action of low-intensity laser irradiation]. **Biofizika**, v.55, n.2, p.350-5, 2010.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; GRAY, M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v.20, n.12, p.2255-7, 1967.

LU, K. et al. Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma. **Skin Res Technol**, v.15, n.4, p.489-95, 2009.

LV, T. et al. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy--in vivo study in a mouse model. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.9, n.2, p.164-9, 2012.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E., JR. Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. **Ann Surg**, v.174, n.3, p.511-20, 1971.

MAISCH, T. et al. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochem Photobiol Sci**, v.3, n.10, p.907-17, 2004.

MARTINS, V.L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E.A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell Tissue Res**, 2012.

METELITSA, A.I.; ALSTER, T.S. Fractionated laser skin resurfacing treatment complications: a review. **Dermatol Surg**, v.36, n.3, p.299-306, 2010.

MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Res**, v.23, n.5A, p.3591-600, 2003.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing an overview. **Clin Plast Surg**, v.30, n.1, p.1-12, 2003.

MORTON, C.A.; MCKENNA, K.E.; RHODES, L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. **Br J Dermatol**, v.159, n.6, p.1245-66, 2008.

OCHSNER, M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases. **Arzneimittelforschung**, v.47, n.11, p.1185-94, 1997a.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J Photochem Photobiol B**, v.39, n.1, p.1-18, 1997b.

PAREKH, S.G. et al. Photodynamic modulation of wound healing with BPD-MA and CASP. **Lasers Surg Med**, v.24, n.5, p.375-81, 1999.

PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v.30, n.3, p.118-48, 2012.

POLLOCK, B. et al. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. **Br J Dermatol**, v.151, n.3, p.616-22, 2004.

RAHBAN, S.R.; GARNER, W.L. Fibroproliferative scars. **Clin Plast Surg**, v.30, n.1, p.77-89, 2003.

SILVA, J.C. et al. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. **Lasers Surg Med**, v.34, n.5, p.451-7, 2004.

SPERANDIO, F.F. et al. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.5, p.581-7, 2010.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am J Surg**, v.176, n.2A Suppl, p.26S-38S, 1998.

STEED, D.L. Wound-healing trajectories. **Surg Clin North Am**, v.83, n.3, p.547-55, vi-vii, 2003.

STERN, S.J. et al. Photodynamic therapy with chloroaluminum-sulfonated phthalocyanine. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.116, n.11, p.1259-66, 1990.

SZEIMIES, R.M. et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8-20 mm), with a 12-month follow-up. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.22, n.11, p.1302-11, 2008.

TOREZAN, L.; NIWA, A.B.; NETO, C.F.[Photodynamic therapy in dermatology: basic principles]. **An Bras Dermatol**, v.84, n.5, p.445-59, 2009.

TOREZAN L., N.C., NIWA A.B.Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de dermatologia**, v.84, n.5, p.445-459, 2009.

TROMBERG, B.J. et al.In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v.52, n.2, p.375-85, 1990.

USHIKI, T.Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Arch Histol Cytol**, v.65, n.2, p.109-26, 2002.

WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S.The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys Med Biol**, v.53, n.9, p.R61-109, 2008.

WITTE, M.B.; BARBUL, A.General principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v.77, n.3, p.509-28, 1997.

ZOUMI, A.; YEH, A.; TROMBERG, B.Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.17, p.11014-11019, 2002.

APÊNDICE I

PILOTO PARA DETERMINAR A DOSE DE IRRADIAÇÃO

Trabalhos científicos avaliando a pele cicatrizada após TFD não tem sido publicados, porém foi necessário realizar este estudo piloto com o intuito de escolher a dose de TFD que for mais adequada para a pele do rato tendo em conta os dois procedimentos por sessão a serem realizados (múltiplas agressões na pele) e o longo período do experimento (aproximadamente 4 meses para o grupo G4)

Foram utilizados 3 animais no total para a realização deste experimento. Os animais foram previamente pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução de Cloridrato de Quetamina a 10% (Ketamina Agener) na dose de 0.08ml/100g de peso corpóreo associado a relaxante muscular, analgésico e sedativo cloridrato de Xilazina 2% (Coopazine®) na dose de 0.04ml/100g. A pele do dorso do animal foi submetida a tricotomia aproximadamente uma área de 6cm de comprimento por 5cm de largura. Posteriormente, foi aplicado o creme contendo ALA em toda a superfície tricomizada, e coberta com papel filme de PVC e papel alumínio para evitar a fotoativação. Após duas horas, foi retirado o excesso de creme usando uma gaze umedecida com solução salina 0,9%. Uma máscara feita de papel alumínio e gaze foi posicionada sobre a pele com um orifício de 1x1, centralizado na área de tratamento. Essa máscara delimitou a área desejada a ser irradiada. Foram escolhidas 4 áreas e irradiadas com diferentes doses de energia (fluência), como apresentado na **Figura 32** e a **Tabela 12**.

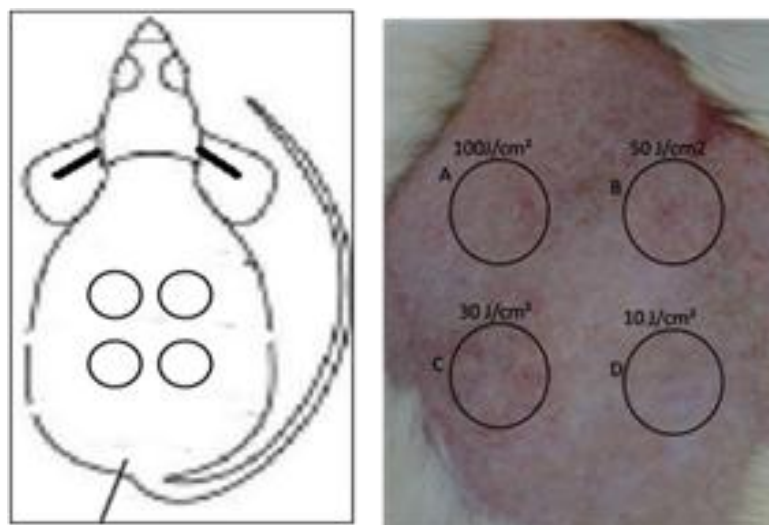


Figura 32: Localização das diferentes doses irradiadas na pele do rato Wistar.

Tabela 12: Doses de energia entregues na superfície da pele do rato. Experimento piloto.

Dose (J/cm²)	Intensidade (mW/cm²)	Tempo (s)
100	50	2000
50	50	1000
30	50	600
10	50	200

Após a iluminação, cada animal foi alojado individualmente. As áreas irradiadas foram avaliadas diariamente, analisando as características macroscópicas da lesão induzida e do processo de cicatrização. Fotografias digitais foram obtidas empregando uma câmera digital Sony DSC-H50. Cada animal foi eutanaciado após a cicatrização completa de todas as lesões, por inalação de CO₂, em seguida, a pele cicatrizada foi removida e cortada com auxílio de um bisturi e colocadas em frascos plásticos contendo solução tamponada de formol ao 10 %. As peças foram mantidas em uma solução com 4,02 g de monofosfato de sódio hidratado, 12,25 g

de difosfato de sódio hidratado, 1000 ml de água destilada, e 111 ml de formaldeído 40% por 48 horas para posteriormente serem desidratadas. Procedimentos feitos na pele dos animais em cada sessão.

As peles tratadas com 100J/cm² e 50J/cm² apresentaram uma lesão severa da pele, cuja cicatrização demorou entre 18-22 dias. A resposta inflamatória da pele tratada com 10J/cm² foi discreta, com cicatrização entre 4-8 dias, o tempo de cicatrização da pele irradiada com 30J/cm² foi entre 12 e 17 dias, já a pele irradiada com 100J/cm² demorou em meia 18 dias. Todas as lesões apresentaram uma cicatrização total, sem evidência de formação de quelóide ou alteração das outras estruturas da pele. A dose de 30 J/cm² foi escolhida para o protocolo experimental por sua moderada resposta inflamatória e tempo de cicatrização, minimizando assim, o desconforto crônico do animal (**Figura 33**).

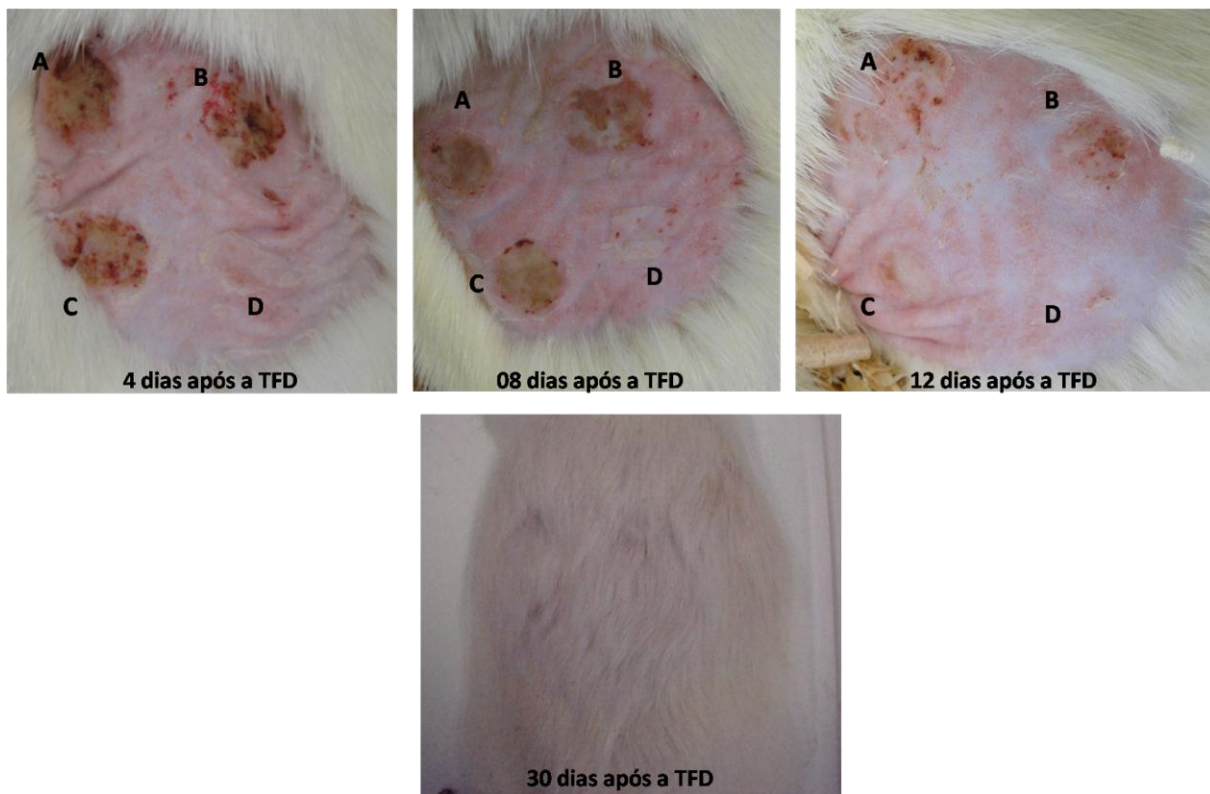


Figura 33: Processo de cicatrização avaliado em diferentes dias, após diferentes doses de TFD. (A) 100 J/cm², (B) 50 J/cm², (C) 30 J/cm², (D) 10 J/cm².

8.

APÊNDICE II

ESTUDO PRELIMINAR DA AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DA PELE DE RATO WISTER APÓS MULTIPLAS LESÕES SEM PREVIA TFD

Com o intuito de avaliar o efeito da lesão do laser de CO₂ na pele do rato sem previa TFD foram avaliados 4 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 200g, provenientes do Biotério do departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais foram mantidos nas mesmas condições dos animais já descritas. Para realizar a lesão com Laser de CO₂ foi usado um Laser de CO₂ que emite na região do 10.600 nm (infravermelho distante), Modelo KSV 25S, MedicalEnergy, Inc., Pensacola, FL) (**Figura 10**). Este equipamento foi escolhido por permitir uma padronização na profundidade da lesão. Foi usado o modo pulsado com frequência de 40Hz e uma potencia de 30W, os mesmos parâmetros usados no trabalho previamente exposto.

A **Figura 34** apresenta a divisão dos grupos experimentais de acordo com a quantidade de sessões feitas.

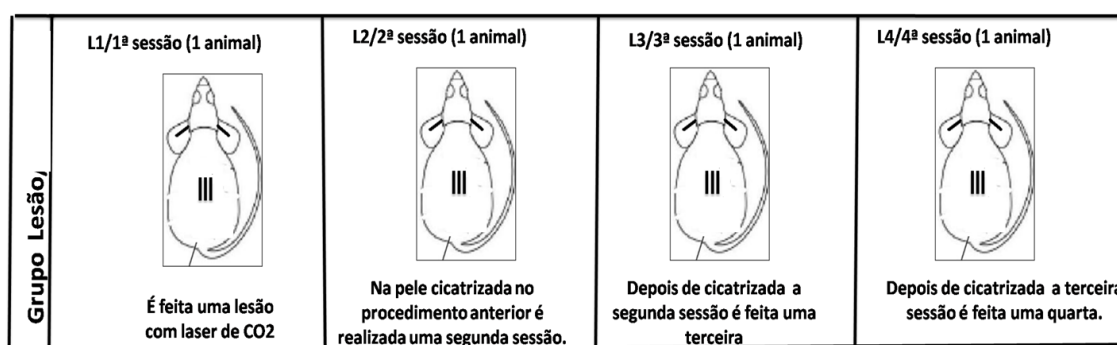


Figura 34: Representação gráfica dos diferentes grupos de animais utilizados neste experimento

Previo anestesia com injeção intramuscular (solução de Cloridato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado a relaxante muscular, analgésico e sedativo cloridrato de Xilazina 2%

(Coopazine®) na dose de 0.04ml/100g, os animais foram submetidos à lesão com laser de CO₂. Três lesões paralelas de aproximadamente 1cm de comprimento foram realizadas na pele sem prévio tratamento com TFD, como apresentado na **Figura 13**. As lesões foram avaliadas diariamente e os critérios para determinar o tempo de cicatrização da pele foram os seguintes:

- Fechamento total da ferida
- Ausência de crosta na área lesada
- Ausência de sangramento ou de qualquer outra secreção fisiológica

No rato L1, foi feita uma lesão, após a cicatrização da mesma foi eutanasiado por inalação de gás CO₂ e coletado o material para estudo histológico. O rato L2, depois de cicatrizar a primeira lesão foi submetida a pele cicatrizada a uma segunda lesão das mesmas características e posteriormente foi eutanasiado. O rato L3 experimentou três vezes esses procedimentos e assim sucessivamente até o L4 como apresenta a **Figura 35**.

L1	L2	L3	L4
Lesão	Lesão	Lesão	Lesão
Eutanásia	Lesão	Lesão	Lesão
	Eutanásia	Lesão	Lesão
		Eutanásia	Lesão
			Eutanásia

Figura 35: Representação esquemática das diferentes sessões a que foram submetidos os animais de cada grupo. (L1) Grupo submetido a uma lesão com laser de CO₂. (L2) O grupo passa duas vezes pelo mesmo

procedimento explicado anteriormente. (L3) O grupo passa três vezes pelo procedimento. (L4) O grupo passa pelo procedimento em quatro ocasiões.

O tempo individual de cicatrização está apresentado na **Tabela 13**. Esses resultados apresentam um tempo de 20 dias para a primeira lesão em todos os ratos, se evidenciando uma leve diminuição na segunda e terceira sessão, sendo a quarta sessão a que apresentou maior tempo em cicatrizar (21 dias). Quando comparados aos grupos (G1-G4), apresentou maior tempo de cicatrização da lesão feita com os mesmo parâmetros com resultado estético inferior como apresentado na **Figura 36**.

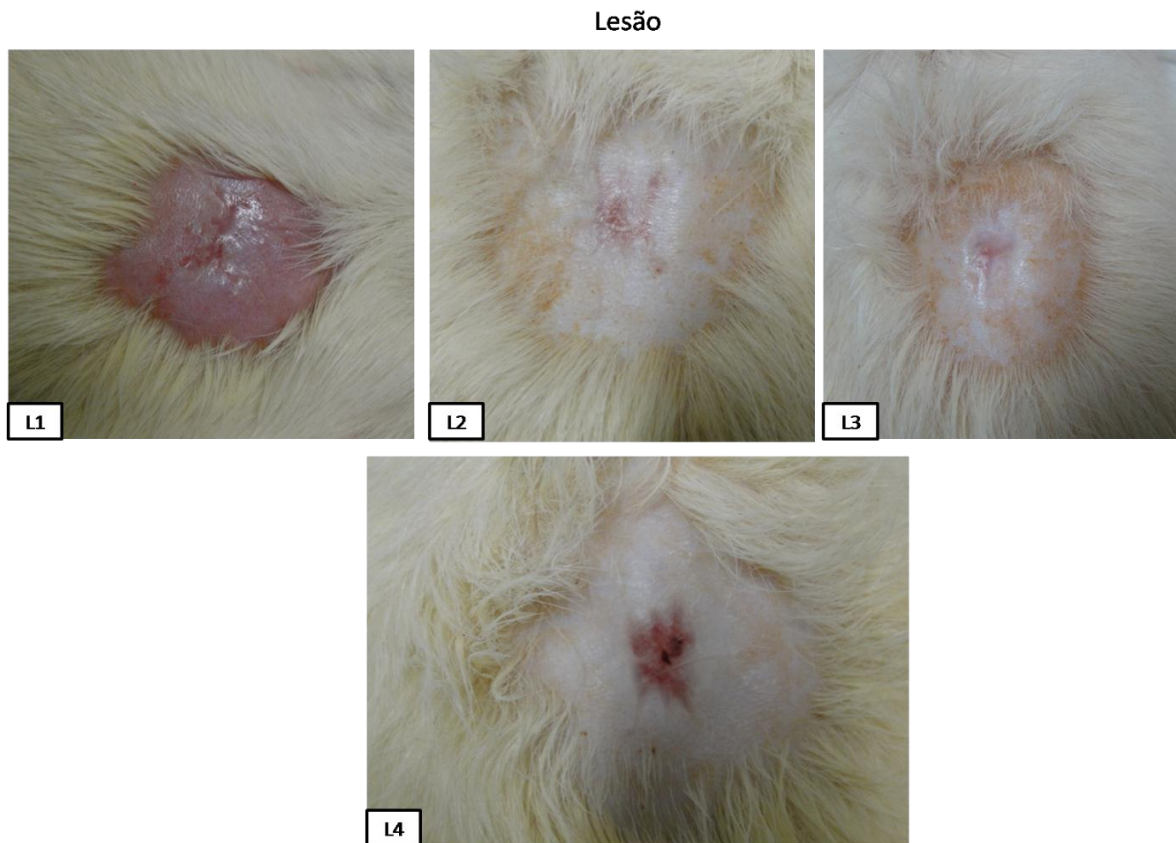


Figura 36:Pele cicatrizada dos diferentes animais que foram submetidos a uma ou varias lesões consecutivas, sem TFD (animais L1, L2, L3 e L4).

Tabela 13:Tempo de cicatrização(dias) da pele de ratos submetida a uma e varias sessões de TFD

L1	L2	L3	L4
20	20	20	20
-	19	18	18
-	-	18	19
-	-	-	21

O analise macroscópico de todos os animais esta apresentado na **Figura 36** e a **Tabela 14**. O animal L1 apresentou uma cicatriz hipertrófica, considerada como 2+/4; este comportamento é possivelmente devida ao efeito do laser de CO₂, na pele. No animal L2 foi evidente uma cicatriz atrófica avaliada como 2+/4 e hiperpigmentação 1+/4. Já para L3 e L4 foram mais acentuadas as mudanças macroscópicas da pele, apresentando cicatriz atrofia de 3+/4 e 4+/4 para L3 e L4 respectivamente. Este resultado estético foi atribuída a uma possível resposta da pele aos traumas consecutivos sofridos, com perdas de tecidos produzidas pelo laser de CO₂.

Tabela 14:Avaliação Clínica da pele dos ratos submetidos á uma ou varias lesões por laser de CO₂

Resultados Clínicos	L1	L2	L3	L4
Eritema Residual (/4+)	0	0	0	0
Cicatriz Hipertrófica (/4)	2	0	0	0
Cicatriz atrófica (/4)	0	2	3	4
Cicatriz hipocrômica (/4)	0	0	0	0
Cicatriz hiperocrômica (/4)	2	1	1	4
Sem cicatriz, pele íntegra	-	-	-	0
Úlcera	0	0	0	0

Comparando a resposta da pele a TFD/Lesão e lesão isolada, foi observado maior dano na pele, representado pela presença de maior grau de atrofia e hiperpigmentação. Quando comparados os grupos G4 (TFD/lesão) e L4 (Lesão isolada) o resultado estético é melhor para o grupo G4 quem apresentou uma melhor reparação do tecido a múltiplas sessões. Estas respostas pode estar relacionada ao estímulo feito pela TFD para acelerar os processos de reparação tecidual (GARCIA et al., 2010; JAYASREE et al., 2001; SILVA et al., 2004; SPERANDIO et al., 2010), estímulo este induzido sobre citocinas tais como IL-1, TGF- β e TNF- α , em MMP e outras substâncias pró-inflamatórias (CHOI et al., 2010). Por fim, o trauma repetitivo e o pouco tempo transcorrido entre cada agressão, somado a ausência do estímulo feito pela TFD no processo de cicatrização prévio, impediu uma completa remodelação do tecido, evidenciada pela pior cicatrização dos ratos dos grupos L.

No estudo microscópico, foram avaliadas lâminas coradas com Veroff para observação e contagem das unidades pilossebáceas por mm^2 . Na avaliação qualitativa, foi evidente que L1 e L2 apresentaram conservação de glândulas sebáceas a diferença de L3 e L4, que apresentou uma diminuição importante nestas estruturas associado à cicatriz fibrótica e atrofia como apresentado na **Figura 37**. O resultado da análise histológica parece indicar um maior dano das unidades pilossebáceas na pele tratada somente com laser de CO_2 , que pode ser explicado pela maior profundidade do dano quando feitas as lesões consecutivamente, e relacionado diretamente com uma cicatrização anormal e fibrótica embora, seja preciso se levar em consideração o menor número de lâminas histológicas estudadas neste grupo. Porém, não é possível chegar a uma conclusão definitiva devido ao número limitado de tecido analisado no caso do grupo lesão.

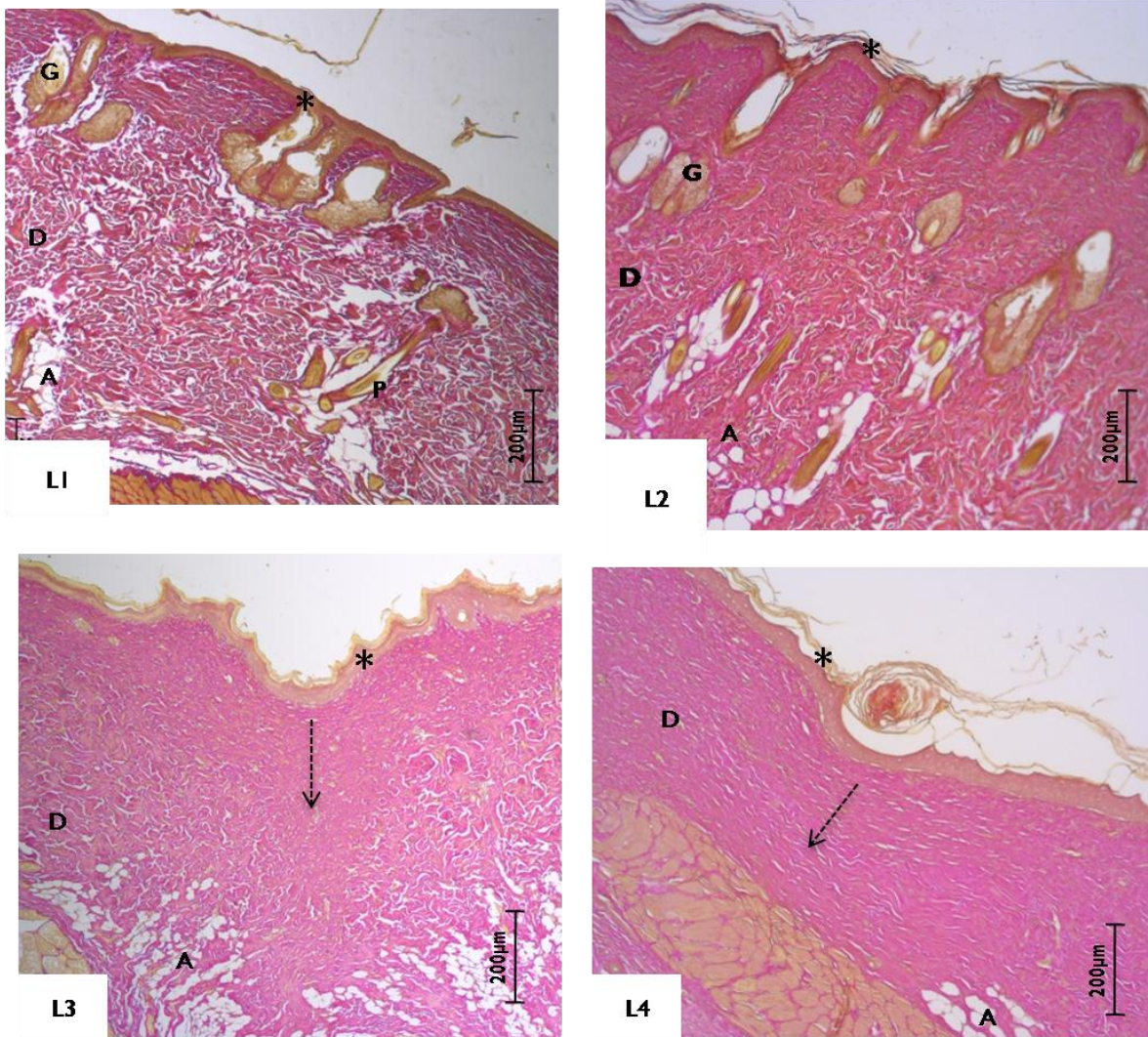


Figura 37: Fotomicrografia demonstrando a derme e epiderme, camadas da pele e as unidades pilossebáceas, compostas do folículo piloso e da glândula sebácea: Epiderme (*); Derme (D); hipoderme com células adiposas (A); Atrofia (setas). Nota-se a ausência de glândulas sebáceas e folículos pilosos nos animais L3 e L4. [verhoff; 50x].

No estudo, com microscopia confocal, foram avaliadas qualitativamente as lâminas histológicas coradas com HE, usando fluorescência de dois fótons e geração de segundo harmônico. A **Figura 38** apresenta a morfologia das fibras de colágeno na camada reticular para os grupos lesão. Para L1, as fibras de colágeno se apresentam delgadas e com disposição desordenada. No grupo L2, as fibras são delgadas e com maior densidade, o que também é observado em L3. No grupo L4, as fibras do colágeno são delgadas e com disposição paralelas.

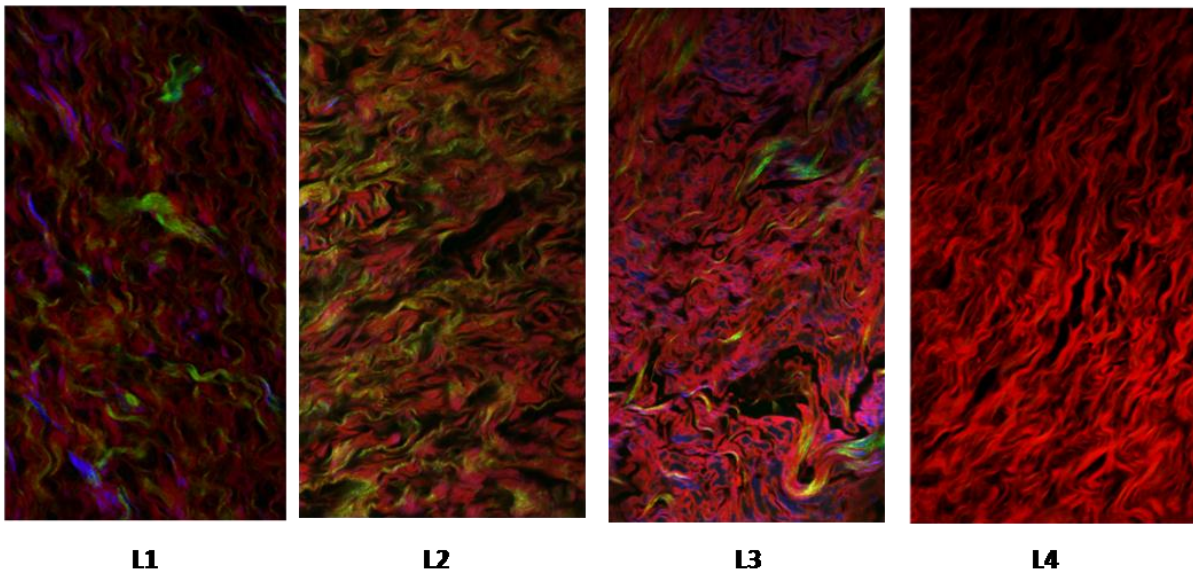


Figura 38: Derme reticular Grupos lesão. Observa-se a espessura, densidade y dispocisão das fibras de colágeno. Fotomicrografias da fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x). O

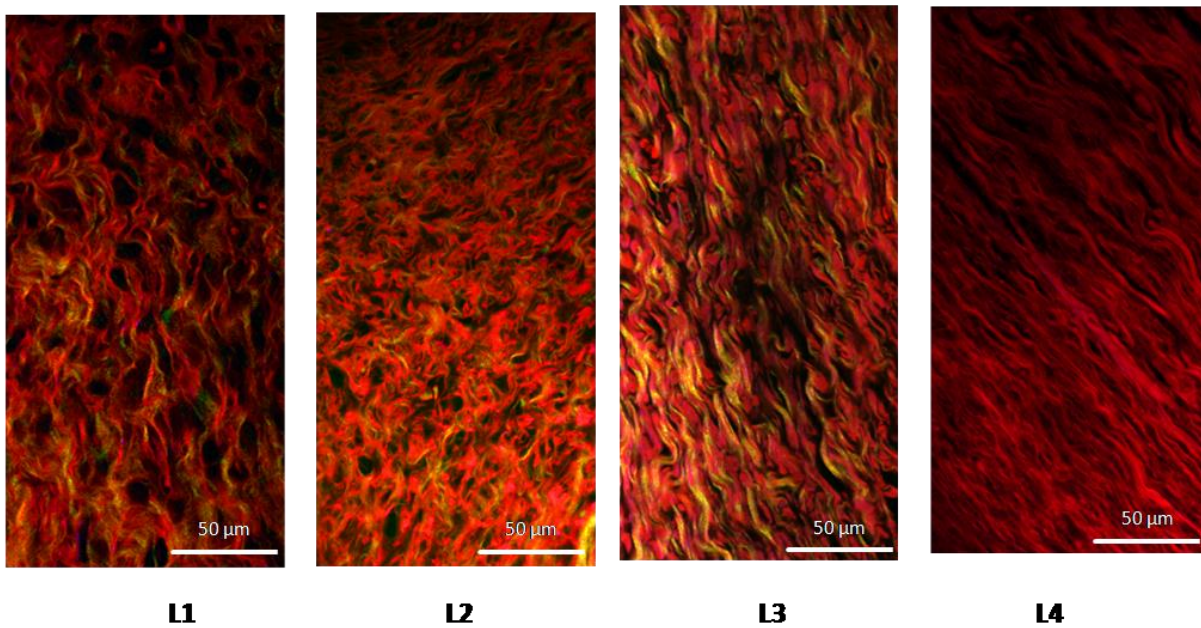


Figura 39: Derme papilar. Observa-se a espessura, densidade y dispocisão das fibras de colágeno. Fotomicrografias da fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x).

Para a derme papilar, as fibras de colágeno se tornam mais desorganizadas, delgadas e densas quando comparadas com a derme reticular. A derme papilar apresenta uma maior diferença morfológica das fibras de colágeno, que sugere que esta camada suporta maior grau de injúria, por sua localização mais superficial. A

presencia destas alterações morfológicas das fibras nas duas camadas nos leva a pensar em um acometimento mais profundo do laser de CO₂ nesta pele tratada.

Na literatura científica é descrita esta morfologia e disposição das fibras de colágeno em lesões fibróticas. Num estudo feito com microscópio multi-fótons para estudo de pele *ex vivo* – obtida de pacientes que se submeteram a cirurgia estética para o tratamento das cicatrizes hipertróficas – foram encontradas fibras colágenas fibrilares (delgadas), com disposição paralela em toda a profundidade do corte (CHEN et al., 2009) e com redução do segundo harmônico, características observadas nas lâminas nos grupos Lesão neste estudo (**Figura 40 e Figura 41**).

Neste estudo foi feita uma avaliação qualitativa da SHG nas lâminas, e foi evidenciado uma diminuição da SHG em todas os grupos, acentuada especialmente em L4 tanto na derme reticular como papilar. Porém, uma diminuição do SHG esta diretamente relacionado com uma diminuição do colágeno tipo I na amostra. Esta diminuição pode ser explicada por um aumento do colágeno tipo III, o qual é mais abundante em cicatrizes imaturas ou por a presença de cicatrização fibrotica. Quando comparada a SHG nos grupos de lesão isolada com os grupos que apresentaram TFD previa é evidente uma diminuição do colágeno tipo I nos grupos Lesão, nos levando a pensar em um maior dano neste grupo. A TFD, como relatado na literatura (GARCIA et al., 2010; SILVA et al., 2004), tende a acelerar o reparo tecidual, trazendo como resultado uma melhor cicatrização da lesão, que se evidencia neste estudo no resultado macroscópico e na qualidade das fibras de colágeno e SHG quando comparado o grupo sem previa TFD ou grupo lesão isolada. Contudo, a quantidade de animais e amostras estudadas são poucos e precisa de maiores estudos.

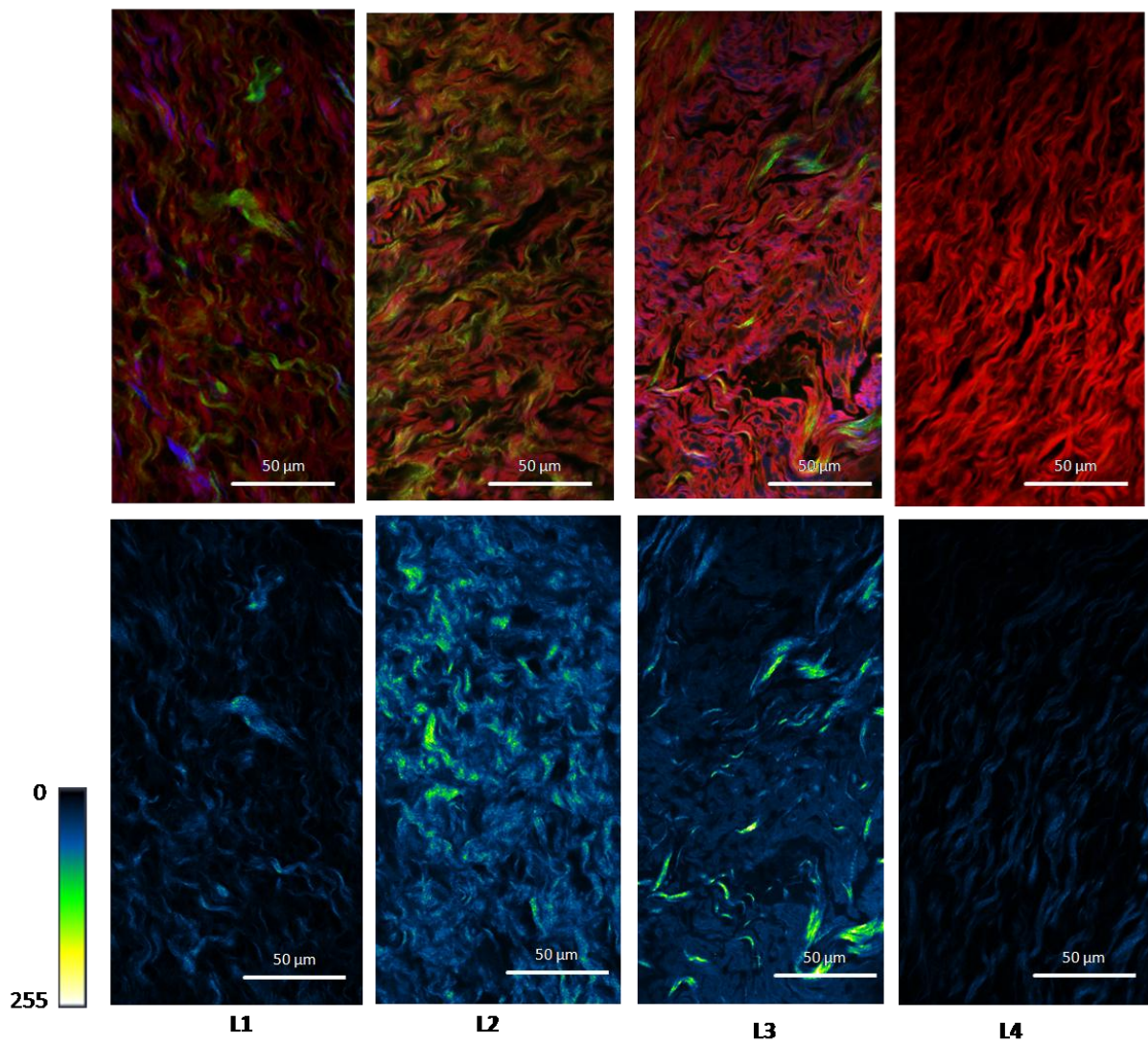


Figura 40:Derme reticular. Imagens representativas da geração do segundo harmônico (cor azul) e fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x)

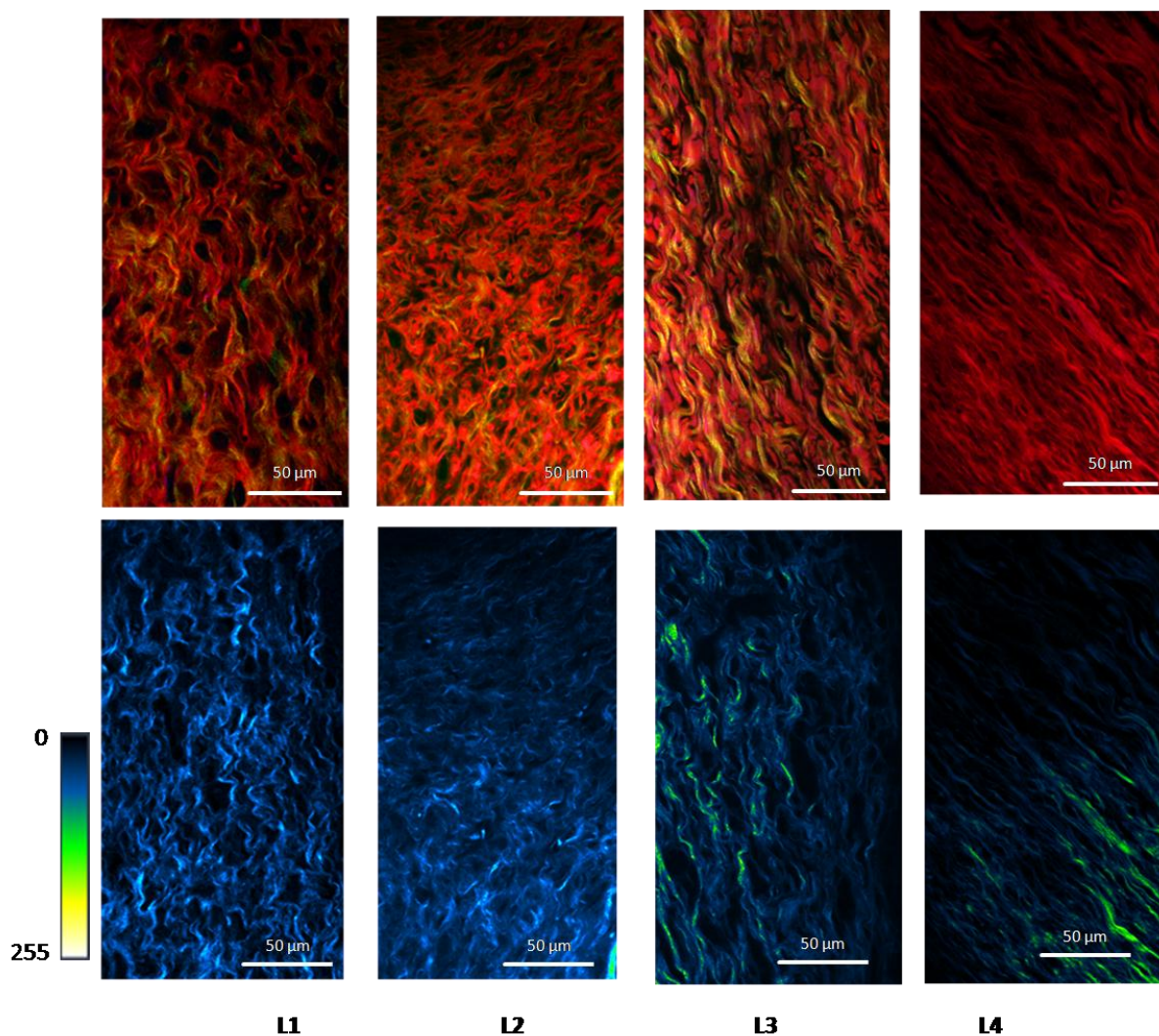


Figura 41: Derme papilar. Imagens representativas da geração do segundo harmônico (cor azul) e fluorescência das fibras de colágeno coradas com HE (400x)

Uma conclusão preliminar deste estudo sugere-se que o grupo que foi submetido a lesões isoladas com laser de CO₂ apresentaram modificações macroscópicas e estéticas desde a primeira sessão. Também foi evidente alterações histológicas e de morfologia das fibras de colágeno em todas as sessões com diminuição do segundo harmônico sugerindo um maior dano na pele.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
n° 047/2011

Protocolo n°. 034/2011

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da cicatrização da pele após várias sessões de terapia fotodinâmica" submetido pela pesquisadora Dora Patrícia Ramirez Angarita.

São Carlos, 18 de outubro de 2011.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais