Roberta Marinho Falcão Gondim

**Avaliação da cicatrização cutânea:
fluorescência e estereologia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof Dr Daniel Romero Muñoz

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6.018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gondim, Roberta Marinho Falcão

Avaliação da cicatrização cutânea : fluorescência e estereologia / Roberta Marinho Falcão Gondim. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Daniel Romero Muñoz.

Descritores: 1.Cicatrização 2.Espectroscopia de fluorescência 3.Histologia
4.Imunoistoquímica 5.Camundongos pelados

USP/FM/DBD-153/12

Dedicatória

Dedicatória

Quantas vezes *chorei*?

Quantas vezes *clamei*?

Quantas vezes me *desesperei*?

...

Deus veio acalantar

Da maneira mais sublime,

Soube dar

Aquilo que precisei

Para continuar seguindo em frente

Anjos vieram em forma de gente

Fizeram acreditar, que, seguir em frente

Era a melhor saída e, assim, fui

Sem mais chorar

E quando vi, estava lá

(...)

Obrigada, meu PAI, por me dar saúde e força para persistir em busca desse sonho. Obrigada por me enviar pessoas tão fundamentais para que eu continuasse a luta! Sem seu apoio, eu nada seria!

*A **Deus**, de infinita misericórdia, **dedico** esse trabalho,
com todo **amor** e **gradidão**.*

Dedicatória

Meus caminhos sempre foram iluminados por seus ensinamentos e orientações. Aprendi muito com o seu exemplo de vida, meu pai! Ensinou-me que todo esforço tem seu retorno e, se estou aqui hoje, o senhor tem grande participação *nisso*. Obrigada, meu pai, por me fazer acreditar nos meus sonhos! Sem sua ajuda, eu não teria suportado essa batalha!

Ao meu amado pai, *João*,

dedico.

Àquela que me amou incondicionalmente durante toda a minha vida. Ensinou-me a enfrentar as adversidades e o significado das lágrimas e, acima de tudo, que as dificuldades fazem parte do amadurecimento e do crescimento. Foi minha guia, me socorrendo nos momentos mais difíceis da minha caminhada. Obrigada por tudo, minha mãe querida!

À minha amada mãe, *Fátima*,

dedico.

Àquele que passou uma infância maravilhosa ao meu lado (...) que se prolonga até hoje, na vida adulta, e assim será até o fim dos nossos dias. Com seu jeito peculiar e fantástico de encarar a vida, soube me dar apoio e incentivo, torcendo e acreditando no meu sucesso. Você é meu anjo da guarda, meu irmão. Obrigada por tudo!

Ao meu amado irmão, *André Luiz*,

dedico.

Agradecimentos

Agradecimentos Especiais

Aos Mestres, agradeço

Ao meu orientador, **Prof Dr Daniel Romero Muñoz**, pela chance concedida, pela confiança, críticas, sugestões e apoio nos momentos necessários. Obrigada por acreditar que eu seria capaz! Enfim, obrigada por tudo!

Ao **Prof Dr Maurício da Silva Baptista** pela oportunidade de realizar grande parte desse trabalho em seu laboratório e pelas sugestões ao trabalho. Sou grata por todo o aprendizado que recebi! Obrigada!

À **Profª Drª Élia Tamaso Caldini** pela receptividade, permitindo a realização de grande parte desse trabalho em seu laboratório, dispondo de toda a estrutura física e acadêmica necessária. Obrigada!

À **Profª Drª Carmem Cinira**, pelas sugestões e críticas ao meu trabalho. Obrigada por estar ao meu lado, acreditando e torcendo pelo meu sucesso!

Agradeço à **Profª Drª Valéria Petri**, todo o incentivo e todo apoio. Sem eles, eu não estaria aqui hoje! Muito obrigada por todos os ensinamentos!

Agradecimentos Especiais

À minha amada família, meu tesouro, meu conforto: **meu pai João, minha mãe Fátima, meu irmão André Luiz e minha cunhada Maria Clara**. Sempre presentes, amáveis, acalentadores, doadores de si em busca do meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por fazerem parte de minha vida! Eu amo muito vocês!

A todos os meus **amigos (as), primos (as), tios (as)** que me deram o apoio que eu precisei para continuar lutando. Agradeço em especial à **Tia Lourdes e Família**, pelo grandioso gesto de me acolher e me apoiar! Obrigada!

Agradeço especialmente às amigas: **Fernanda Corbi, Luciane Cela, Raquel Bueno e Roberta Zanella**. Vocês foram meu porto seguro em São Paulo. Sem a ajuda e apoio de vocês talvez eu tivesse desistido ao longo dessa caminhada. Vocês foram fundamentais nesse trabalho! Muito obrigada!

Aos **colegas do Instituto Oscar Freire**, pelo apoio, cumplicidade, amizade e carinho. Agradeço a paciência e amizade dos (as) colegas: **Adriana, Raquel, Talita e Victor**. Vocês acompanharam de perto essa jornada e sempre torceram por mim. Obrigada! Agradeço ainda aos funcionários **Onedes Júnior, Solange, Gorete, Dirce, Branca, Paula e Waltair** pelo apoio e fundamental paciência quando solicitados.

Aos **colegas do laboratório do Prof Dr Maurício da Silva Baptista**, pela convivência, pela amizade e pelos ensinamentos. Agradeço a **Daiana, Daniela, Alice, Adjaci, Suellen, Alexandre, Christiane, Patrícia, Waleska, Décio, Orlando** e a todos com quem convivi durante os trabalhos no laboratório e me apoiaram quando precisei. Obrigada!

Agradeço, especialmente, ao meu grande amigo **Vinicius Cursino**, pela paciência em me ajudar a entender o aparelho de *espectroscopia*. Obrigada por ter me apoiado nas etapas mais importantes do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas **do laboratório da Dr^a Élia Tamaso (LIM 59)**. Aos funcionários: **Felipe, Gildásio, Nilda, Cristina** (*in memoriam*) **e Valéria**. Agradeço a **Iris Amorin** pelo precioso apoio e paciência em me ajudar nos cortes histológicos. Pela ajuda durante os trabalhos que se estendiam até tardar. Muito obrigada!

Agradeço, especialmente, a **Mariana Veras**, por ter encontrado tempo para me ajudar a entender a *estereologia*, sua ajuda foi muito importante. Obrigada!

Agradeço especialmente a **Marcelo Alves**, pela ajuda na calibração do microscópio e dos programas para leitura das lâminas e nas análises estatísticas. Muito Obrigada!

Aos técnicos do **Laboratório de Patologia da FMUSP**, em especial à **Kelly**, que teve participação importante na confecção das lâminas. Obrigada!

Aos técnicos do **Laboratório de Imunoistoquímica da FMUSP**, especialmente a **Ângela**, por ajudar no processamento dos materiais. Obrigada!

Às secretárias do programa de Fisiopatologia Experimental, **Tânia e Liduvina**, pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento desse trabalho. Obrigada!

Agradeço a todos os meus ***pacientes***. Vocês são fonte de eterna inspiração! A busca pelo novo, pelo melhor e, sobretudo, a busca por minimizar a dor e o sofrimento de vocês me traz força ao dia-a-dia! Muito obrigada pela confiança!

Por fim,

agradeço o apoio financeiro:

Fundação Faculdade de Medicina (FFM) – verba do Instituto Oscar Freire (IOF). Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Prof Dr Daniel Romero Muñoz.

FAPESP - Verba do temático nº 0551598-7 do Instituto de Química da USP (IQ-USP). Laboratório de Processos Fotoinduzidos e de Interfaces (LPFI) – Prof Dr Maurício da Silva Baptista.

LIM – 59 – Apoio financeiro com materiais para cortes histológicos. Laboratório de Biologia Celular (LIM – Laboratório de Investigação Médica- 59). Profª Drª Élia Tamasso Caldini.

"Uma mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original."

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Estruturação da tese: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento do tema	1
1.2 Revisão da literatura	5
1.2.1 A pele	5
1.2.2 Cicatrização da pele	7
1.2.3 Uso de técnicas de fluorescência no exame da pele	10
1.2.4 Espectroscopia e Espectroscopia de Fluorescência	12
1.2.5 Estereologia geral e do tecido cutâneo	19
2 OBJETIVOS	25
3 MÉTODOS	27
3.1 Protocolo experimental	27
3.2 Amostra utilizada	27
3.3 Grupos estudados e periodicidade das análises	28
3.4 Procedimento cirúrgico	28
3.4.1 Técnica operatória	28
3.4.2 Cuidados especiais durante o procedimento cirúrgico	29
3.5 Espectroscopia de Fluorescência	30
3.5.1 Sistema de aquisição e coleta da fluorescência	30
3.5.2 Captação da espectroscopia de fluorescência	31
3.5.2.1 Técnica de captação	31
3.5.2.2 Especificações da técnica de coleta de fluorescência	32
3.6 Coleta, processamento e análise dos fragmentos de pele	34
3.6.1 Coleta dos fragmentos de pele	34
3.6.2 Processamento do material	35
3.6.2.1 Microscopia óptica	35
3.6.2.1.1 Inclusão e corte do material	36
3.6.2.2 Microscopia de fluorescência	39

3.6.3 Análise das lâminas	40
3.6.3.1 Análise bidimensional e tridimensional (estereologia)	40
3.6.3.2 Análise histológica das fibras colagênicas	44
3.6.3.3 Imunoistoquímica com PCNA	46
3.6.3.4 Microscopia de fluorescência	46
3.7 Análises estatísticas	47
4 RESULTADOS	50
4.1 Acompanhamento dos animais	50
4.2 Análises macroscópica e dermatoscópica do ferimento cirúrgico	50
4.2.1 Avaliação macroscópica no 2° dia de PO	51
4.2.2 Avaliação macroscópica no 5° dia de PO	52
4.2.3 Avaliação macroscópica no 8° dia de PO	52
4.2.4 Avaliação macroscópica no 11° dia de PO	52
4.2.5 Avaliação macroscópica no 14° dia de PO	53
4.2.6 Avaliação macroscópica no 20° dia de PO	53
4.2.7 Avaliação macroscópica no 27° dia de PO	55
4.2.8 Avaliação macroscópica no 34° dia de PO	55
4.2.9 Avaliação macroscópica no 41°, 48°, 55° e 76° dias de PO	55
4.3 Análise histológica qualitativa	57
4.3.1 Avaliação histológica no 2° dia de PO	57
4.3.2 Avaliação histológica no 5° dia de PO	59
4.3.3 Avaliação histológica no 8° dia de PO	60
4.3.4 Avaliação histológica no 11° dia de PO	62
4.3.5 Avaliação histológica no 14° dia de PO	64
4.3.6 Avaliação histológica no 20° dia de PO	66
4.3.7 Avaliação histológica no 27° dia de PO	68
4.3.8 Avaliação histológica no 34° dia de PO	70
4.3.9 Avaliação histológica nos 41°, 48°, 55° e 76° dias de PO	72
4.4 Análise qualitativa da imunomarcção com PCNA	73
4.5 Análise quantitativa	77
4.5.1 Análise bidimensional (2D)	77
4.5.2 Análise tridimensional (3D)	80
4.5.3 Análise da imunomarcção com PCNA	82

4.5.4 Análise quantitativa do colágeno	83
4.6 Análises de fluorescência	84
4.6.1 Espectroscopia de fluorescência	84
4.6.2 Microscopia de fluorescência	89
5 DISCUSSÃO	93
6 CONCLUSÕES	119
7 ANEXOS	121
8 REFERÊNCIAS	126

Lista de Figuras

Figura 1: Aparelhagem para coleta dos espectros de fluorescência. a) LED azul, 405nm; b) aparelho <i>Ocean Optics</i> com conexão USB para o microcomputador; c) detalhe da sonda coletora dos espectros de fluorescência	30
Figura 2: Espectro de fluorescência da PpIX, com área sombreada demarcando sua faixa representativa, utilizada para os cálculos dos valores de fluorescência	34
Figura 3: Representação esquemática do procedimento de inclusão e amostragem do fragmento de pele para técnica de estereologia	37
Figura 4: Representação esquemática da técnica de interceptos ortogonais, utilizada na mensuração das medidas bidimensionais nos cortes histológicos (programa <i>ImageJ</i> ®)	41
Figura 5: Representação esquemática do “ <i>gride</i> ” utilizado para contagem dos pontos sobre campo selecionado de corte histológico - técnica de estereologia - (programa <i>ImageJ</i> ®)	42
Figura 6: Cortes histológicos corados em <i>Picrosírius</i> , mostrando o processamento da imagem para cálculo da área correspondente ao colágeno (Programa <i>Image ProPlus</i> ®)	45
Figura 7: Fotografias de ferimentos em cicatrização nos dias: 2, 5, 8, 11, 14 e 20 de pós-operatório (PO). Fotografias com e sem lente de aumento de 20X (Dermatoscópio <i>Dermlite PROHR</i> ®)	54
Figura 8: Fotografias de ferimentos em cicatrização nos dias: 27, 34, 41, 48, 55 e 76 de pós-operatório (PO). Fotografias com e sem lente de aumento de 20X (Dermatoscópio <i>Dermlite PROHR</i> ®)	56
Figura 9: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 2° dia de PO	58
Figura 10: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 5° dia de PO	59

Figura 11: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 5° dia de PO	60
Figura 12: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 8° dia de PO	61
Figura 13: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 8° dia de PO	62
Figura 14: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 11° dia de PO	63
Figura 15: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 11° dia de PO	64
Figura 16: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 14° dia de PO	65
Figura 17: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 14° dia de PO	66
Figura 18: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 20° dia de PO	67
Figura 19: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 20° dia de PO	68
Figura 20: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 27° dia de PO	69
Figura 21: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 27° dia de PO	70
Figura 22: Fotomicrografia de corte histológico (HE) no 34° dia de PO	71
Figura 23: Fotomicrografia de corte histológico (<i>Picrosírius</i>) no 34° dia de PO	72
Figura 24: Fotomicrografias de lâminas marcadas por PCNA (imunoistoquímica), nos dias 2, 5, 8, 11, 14 e 20 de PO	75

Figura 25: Fotomicrografias de lâminas marcadas por PCNA (imunoistoquímica), nos dias 27, 34, 41, 48, 55 e 76 de PO	76
Figura 26: Representação gráfica da variação quantitativa bidimensional das estruturas ao longo da cicatrização (camada córnea, epiderme, derme e anexos epiteliais)	79
Figura 27: Representação gráfica da variação quantitativa tridimensional das estruturas em cicatrização (coágulo, infiltrado inflamatório, camada córnea, epiderme e anexos epiteliais)	81
Figura 28: Representação gráfica da variação da imunomarcção (PCNA) ao longo do tempo	82
Figura 29: Variação quantitativa do colágeno ao longo da cicatrização (teste de <i>Pearson</i>)	83
Figura 30: Gráfico das intensidades médias de fluorescência para sítios de coleta (ferimento em cicatrização e pele sã, com e sem MAL)	86
Figura 31: Gráfico da variação da intensidade de fluorescência para todos os grupos estudados, em todos os tempos avaliados no experimento (dias de pós-operatório)	87
Figura 32: Gráfico da intensidade de fluorescência da pele em cicatrização com MAL (+/+) ao longo do tempo, teste de <i>Pearson</i>	88
Figura 33: Correlação da intensidade de fluorescência e imunomarcção com PCNA ao longo do tempo avaliado (dias de pós-operatório - teste de <i>Pearson</i>)	89
Figura 34: Corte histológico de congelação para microscopia de fluorescência - fase precoce da cicatrização	91
Figura 35: Cortes histológicos – microscopia de fluorescência e convencional (HE) – fase tardia da cicatrização	91

***Lista de abreviaturas,
símbolos e siglas***

ALA	Ácido aminolevulínico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
DPO	Dia de pós-operatório
EF	Espectroscopia de Fluorescência
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicanos
H&E	Hematoxilina e Eosina
IF	Intensidade de Fluorescência
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
JDE	Junção dermo-epidérmica
LED	Diodo emissor de luz
LW	Luz de <i>Wood</i>
µm	Micrômetro
MAL	Metil-aminolevulinato
MEC	Matriz extracelular
MF	Microscopia de fluorescência
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
nm	Nanômetro
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> – Antígeno de proliferação celular nuclear
PGs	Proteoglicanos
pH	Concentração hidrogeniônica
PO	Pós-operatório
PpIX	Protoporfirina IX
SF 0,9%	Soro Fisiológico 0,9%
TGF	Fator de crescimento transformador
UPA	Ativador do plasminogênio uroquinase
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
(+ / +)	Grupo experimental – lesão em cicatrização com uso de MAL
(- / +)	Grupo experimental – pele normal adjacente com uso de MAL
(+ / -)	Grupo controle – pele em cicatrização sem uso de MAL
(- / -)	Grupo controle – pele normal adjacente sem uso de MAL

Resumo

Resumo

Gondim RMF. Avaliação da cicatrização cutânea: fluorescência e estereologia [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Objetivos: Recentemente, a Espectroscopia de Fluorescência (EF) tem sido estudada como método de análise de propriedades da pele de forma não-invasiva e em tempo real, utilizada em uma variedade de aplicações, incluindo avaliação e diagnóstico do tecido *in vivo*. Contudo, na cicatrização da pele, essa técnica não tem sido completamente explorada. Visto que a determinação da idade de uma lesão é um aspecto importante na medicina forense, esse trabalho tem por objetivo testar a aplicabilidade da medida da Intensidade de Fluorescência (IF) após o uso de metil-aminolevulinato (MAL) na estimativa da idade de lesão incisa, através da EF ao longo do tempo e fazer a correlação desta com os achados histológicos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados camundongos *hairless* como modelo experimental. Os animais foram divididos em dois grupos: com (+) e sem (-) o uso de MAL antes da EF. Incisões cirúrgicas lineares foram realizadas no dorso de cada animal. Espectros na faixa de 480 e 800 nm foram coletados da lesão e da pele normal adjacente, usando o sistema *Ocean Optics*, correspondendo a quatro condições: a) IF da lesão após MAL (+/+); b) IF da pele normal após MAL (-/+); c) IF da lesão sem MAL (+/-) e d) IF da pele normal sem MAL (-/-). Após a cirurgia, os animais foram monitorados periodicamente até 3 meses de pós-operatório e eutanaziados em grupos. Fragmentos de pele, contendo todo o ferimento, foram removidos e processados para análise histológica por métodos estereológicos. Vários cortes histológicos foram analisados para avaliar a organização da derme e da epiderme, deposição de colágeno e proliferação celular (imunoistoquímica por PCNA). **Resultados:** Nas fases iniciais da cicatrização, a EF *in vivo* mostrou acúmulo preferencial de protoporfirinas na lesão com uso de MAL (+/+), quando comparado à pele normal adjacente (-/+).

Contudo, nas fases avançadas, ocorreu o inverso. Houve uma diferença estatisticamente significativa neste grupo (+/+) ao longo do tempo ($p < 0,0001$), o que não aconteceu com os demais ((-/+); (+/-) e (-/-)). O modelo apresentado permitiu a estimativa da idade de lesão incisa no intervalo de dois meses, sendo possível estimar a fase de cicatrização em que esta se encontra. Achados histológicos confirmaram as fases da cicatrização, mostrando correlação com os achados de fluorescência. **Conclusão:** Os resultados mostraram que a técnica de EF usando MAL é um método promissor na análise dos estágios da cicatrização da pele.

Descritores: 1) Cicatrização; 2) Espectrometria de Fluorescência; 3) Histologia; 4) Imunoistoquímica; 5) Camundongos pelados.

Abstract

Abstract

Gondim RMF. Evaluation of skin healing: fluorescence and stereology [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Background and Objective: In recent years, Fluorescence Spectroscopy (FS) has been explored as a novel noninvasive and real-time technique for analysis of skin properties, useful in a wide variety of applications, including tissue evaluation and diagnosis. However, the use of FS in skin wound healing has not been fully explored. Since aging of injuries on a victim's body is an important aspect of forensic medicine, this paper intended to test the usefulness of collecting Fluorescence Intensity (FI) after topical MAL on age estimate of the incised lesion, through the study by FS over time and correlation with histological findings. **Materials and Methods:** As experimental model, was used *hairless* mice. The mice were divided into two groups: with (+) and without (-) use MAL before FS. Standardized linear wounds were made on the dorsum of each mice. Spectra in the 480-800 nm wavelength range were collected from normal and wound skin using *Ocean Optics* system, corresponding to four conditions: a) FI of skin wound after MAL (+/+); b) FI of normal skin after MAL (-/+); c) FI of skin wound without MAL (+/-) and d) FI of normal skin without MAL (-/-). After wounding, the animals were monitored periodically until 3 months and killed in groups. Tissue specimens, containing the whole wound, were removed and processed for histological analysis using stereological techniques. Several cross-sections were analyzed to evaluate the organization of the dermis and epidermis, collagen deposition and cellular proliferation (PCNA - imunohistochemistry antigen). **Results:** *In vivo* FS of skin wound healing with MAL (+/+) showed that there was a protoporphyrin preferential accumulation in healing site as compared to adjacent normal skin (+/-) in the early stage of healing. However, in the later stages, the reverse happened. There was statistically significant into this group (+/+) along the time ($p < 0,0001$); what not

happened with another groups ((-/+); (+/-) and (-/-)). The model allows to estimate the age of an incised injury into interval of two months. It's possible to estimating his healing phase. Histological findings confirm the stages of healing and agree well with the fluorescence findings. **Conclusion:** The results showed that FS using MAL appears to be a promising approach for the analysis of stages of skin wound healing.

Descriptors: 1) Wound healing; 2) Fluorescence spectrometry; 3) Histology; 4) Immunohistochemistry; 5) *Hairless* mice.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento do Tema

A Medicina Legal é uma ciência multidisciplinar, engloba conhecimentos médicos e de outras áreas do saber, subdivide-se em ramos como: Traumatologia, Tanatologia e Sexologia. A *Traumatologia Médico-Legal* estuda as lesões produzidas por violência, nos aspectos médicos e legais. É um dos temas mais presentes nas perícias das instituições especializadas (França, 2005).

A prática do médico perito permite intercâmbio com o processo jurídico, no âmbito criminal, cível ou trabalhista. Seu trabalho apresenta informações de caráter técnico que podem influenciar na decisão dos julgadores, sendo, muitas vezes, a única maneira de elucidar detalhes processuais.

Nos Institutos de Medicina Legal, o exame de lesões corporais é uma das práticas médicas mais realizadas. As lesões podem ser produzidas por vários meios, sendo aquelas produzidas por meio mecânico, as mais frequentes, talvez pela acessibilidade de objetos utilizados para esse fim. Os resultados da ação mecânica sobre o corpo humano podem ser: rubefação, escoriações, ferimentos, equimoses, hematomas e fraturas (Hercules, 2005).

Nas violências físicas, a pele, devido a sua localização e extensão, é o primeiro órgão a ser atingido e o mais frequentemente afetado, fazendo com que as lesões dermatológicas sejam uma das mais reconhecíveis formas de agressão física (Chadwick, 1997; Coulter, 2000). Assim, cerca de 90% das vítimas de violência apresentam lesões de pele ao exame (Stephenson, 1995), constituindo prática frequente do perito médico-legal (Hayashi *et al.*, 2004).

O exame da pele é uma das atividades mais realizadas na prática forense (Hayashi *et al.*, 2004); apesar disso, é um desafio para os médicos, exigindo a capacidade de reconhecer lesões e padrões associados às condições clínicas e

periciais. Segundo Garg e colaboradores (2008), a análise e descrição das lesões de pele podem ser comparadas à observação de uma pintura, quando em primeiro lugar, faz-se uma avaliação geral do paciente e, em seguida, um olhar mais detalhado para as lesões. Com isso, pode-se analisar tonalidade, superfície, regularidade das bordas, distribuição, turgor, consistência, dentre outras características.

A determinação da idade da lesão tem sido considerada um dos problemas médico-legais mais importantes (Psaroudakis *et al.*, 2001), uma vez que auxilia significativamente na investigação criminal (Liu *et al.*, 2006). As lesões podem ser divididas em recentes, intermediárias e antigas. Tradicionalmente, na estimativa de tempo das lesões, é descrito o espectro equimótico de *Le Gran du Saulle*, em que a mudança no padrão de coloração das lesões pode ajudar na determinação da idade da mesma. As equimoses passam pelas seguintes colorações: violáceas, azuladas, esverdeadas e amareladas, até sumirem completamente (Hercules, 2005).

Neste campo, de estimativa da idade da lesão, várias técnicas vêm sendo estudadas em pesquisa, sendo, a imunoistoquímica, uma das mais descritas. Nesses trabalhos, é realizada identificação e/ou quantificação de moléculas inflamatórias ou citocinas (Kondo, 2007), como: Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) (Takamiya *et al.*, 2005), Fatores Transformadores do Crescimento (TGF) (Grellner *et al.*, 2005), dentre outras. Contudo, utilizada isoladamente, como nesses trabalhos, pode ser uma técnica de alto custo, de difícil execução e invasiva.

As lesões cutâneas acarretam alterações na estrutura anatômica e na função fisiológica da pele. De acordo com a profundidade, podem ser chamadas de escoriação, quando atingem apenas a epiderme, a camada mais superficial da pele, o que ajuda no seu fechamento precoce e, geralmente, não deixa cicatriz. Essas lesões são frequentes na prática forense, mas, comumente, não suscitam dúvidas quanto à idade das mesmas ao exame de corpo de delito.

Os ferimentos cutâneos propriamente ditos são aqueles que atingem todas as camadas da pele e tecido celular subcutâneo, sendo este o foco do presente trabalho. Devido à profundidade atingida, seu fechamento resulta na formação de uma marca, a cicatriz. Em busca de uma metodologia para estudar a idade de lesões em cicatrização e lesões cicatriciais recentes da pele, procura-se, nesse trabalho, utilizar um método não invasivo e de fácil execução. Assim, o objetivo do protocolo que se segue, é estudar a estimativa da idade do ferimento cutâneo através da Espectroscopia de Fluorescência (EF).

A técnica de EF tem sido frequentemente estudada *in vitro* e *in vivo* para caracterização e monitoração de moléculas, células e tecidos biológicos (Mokry *et al.*, 2006). É uma técnica diagnóstica não invasiva baseada no registro digital da fluorescência obtida de fluoróforos presentes no tecido (Stenquist *et al.*, 2006), endógenos ou exógenos. Devido à sensibilidade na determinação de estruturas biológicas tem sido também conhecida como biópsia óptica (Thomsen, 1998). Mostra-se promissora e apresenta vantagens em relação a outros métodos de investigação, já que possui acessibilidade, rapidez e segurança para obtenção dos resultados. Baseia-se nos espectros de interesse a partir do fluoróforo em estudo, sobretudo a partir da intensidade de fluorescência observada. Dessa forma, utilizando metil-aminolevulinato (MAL) tópico, indutor do fluoróforo endógeno Protoporfirina IX (PpIX), a aplicação da técnica de EF pode ser realizada no estudo da cicatrização cutânea.

A seguir, serão discutidos aspectos importantes sobre a estrutura anatômica e microscópica da pele; fisiologia da cicatrização cutânea e o uso de técnicas de fluorescência e de espectroscopia em ciências médicas e biológicas, sobretudo, aplicadas ao tecido cutâneo.

Revisão da literatura

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1 A pele

A pele funciona como revestimento protetor do corpo, formando uma fronteira entre o organismo e o meio ambiente (Dângelo e Fattini, 2000). É constituída por três camadas: uma superficial, com células epiteliais intimamente unidas, a *epiderme*; uma intermediária, de tecido conjuntivo, a *derme*; e, mais profundamente, está a *hipoderme*, constituída predominantemente por tecido adiposo (Junqueira e Carneiro, 1985).

Em virtude de ser um órgão complexo, a pele apresenta um processo dinâmico de células, tecidos e elementos de matriz que medeiam um conjunto diversificado de funções: barreira física e imunológica, termorregulação, proteção contra a radiação ultravioleta (UV), produção de vitamina D, reparo e regeneração. A *epiderme*, *derme* e *hipoderme* desempenham seus papéis de forma interdependentes e sofrem regulação e modulação molecular e celular no desempenho das suas funções (Chu, 2008).

A *epiderme*, formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, é formada por queratinócitos (> 90%) e contribui com grande parte da função de barreira física. É avascular e se nutre por difusão, a partir dos capilares da derme superficial. Renova-se continuamente e dá origem aos anexos, como as unidades pilosebáceas e glândulas sudoríparas (Murphy, 2005).

A camada basal da epiderme é a sua porção proliferativa e está intimamente ligada à Membrana Basal (MB). Acima dela, ficam os queratinócitos mais maduros, nas camadas espinhosa e granulosa. O estrato córneo é formado por queratina e queratinócitos terminalmente diferenciados, sendo a porção mais externa da epiderme. Intercalados entre os queratinócitos estão outros tipos celulares, tais como: melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (Murphy, 2005).

A junção dermo-epidérmica (JDE) forma a interface entre a *epiderme* e a *derme*. Além de uni-las, oferece resistência contra as forças de cisalhamento externo, serve como barreira semipermeável e possui papel crucial na sinalização do crescimento e regeneração da pele (Ghohestani *et al.*, 2001).

A *derme* é formada por fibras filamentosas difusas, matriz amorfa e células do tecido conjuntivo. Acomoda as redes nervosas e vasculares, apêndices epidérmicos e várias células, como: fibroblastos, macrófagos e células do sistema imune (Junqueira e Carneiro, 1985).

O tecido conjuntivo da *derme* é formado por uma matriz amorfa e fibras: elásticas, reticulares e colágenas. Estas chegam a representar 75% do peso seco da pele (Kielty e Shuttleworth, 1997) e apresentam distribuição e formato variado: se superior (*derme papilar*) ou inferior (*derme reticular*) (Chang *et al.*, 2002). A matriz amorfa da *derme* é constituída principalmente por glicoproteínas não filamentosas, proteoglicanos (PG) e os glicosaminoglicanos (GAG). Essa matriz forma um verdadeiro plasma intersticial, com papel na ligação molecular de água, aumentando a concentração de fatores de crescimento, influenciando na proliferação, diferenciação e reparo tecidual (Iozzo *et al.*, 2001).

A camada mais profunda do sistema tegumentar, a *hipoderme*, serve como reserva energética e isolamento térmico, amortece a pele e permite sua mobilidade sobre as estruturas adjacentes. O limite entre a *derme* profunda e a *hipoderme* é uma transição abrupta de tecido conjuntivo para um tecido predominantemente adiposo. Apesar dessa distinção, as duas regiões são funcionalmente integradas por terminações nervosas, vasos e apêndices epidérmicos (Koutnikova e Auwerx, 2001). A *hipoderme* é formada por adipócitos organizados em lóbulos, separados por septos de tecido conjuntivo que contém nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Holst e Grimaldi, 2002).

Os estudos anatômicos e histológicos da pele procuram separar didaticamente as diversas camadas de células e elementos constituintes do tecido cutâneo. Entretanto, a pele pode ser compreendida como um órgão

complexo, extenso e dinâmico, responsável por diversas funções biológicas e passível de interferências que podem alterar o desempenho das suas atribuições.

1.2.2 Cicatrização da pele

A pele, devido a sua extensão e exposição, é mais vulnerável do que outros órgãos aos fatores externos, tais como: biológicos, físicos e químicos. Após uma injúria, uma cascata de eventos se inicia para reparar o dano sofrido e mediadores inflamatórios interagem, gerando respostas vasculares e celulares (Greaves e Camp, 1988).

Após injúria, o tecido vivo pode reparar-se de duas maneiras distintas: regeneração ou cicatrização. Regeneração significa restauração da arquitetura original. Nos seres vivos, são poucos os tecidos que apresentam a capacidade de regenera-se estruturalmente; a maior parte deles cursa com restauração funcional e não anatômica. A essa restauração funcional dá-se o nome de cicatrização (Izadi e Ganchi, 2005). Porém, didaticamente, os termos serão mencionados ao longo do texto como sinônimos, assim como os demais trabalhos que abordam o tema.

A extensão e profundidade da lesão influenciam no processo de reparo da mesma. As feridas de espessura total, ou seja, que atingem até a hipoderme, dependem da migração e proliferação dos queratinócitos das bordas das lesões, geralmente cursam com cicatrização mais lenta e resultam na formação de cicatriz (Ramasastry, 2005).

Há quatro fases no reparo cutâneo: a coagulação ou hemostasia, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação. Essas fases, no entanto, não são estritamente separadas, mas se sobrepõem umas às outras. A fase de coagulação começa imediatamente após a injúria e termina entre o terceiro e quinto dia. Porém, a partir do terceiro dia, se sobrepõe à fase

proliferativa. Depois, a cicatrização continua com a fase de remodelação que, nos seres humanos, pode se prolongar por até 02 anos (Mokrý *et al.*, 2006).

Com o rompimento de vasos sanguíneos, há liberação de elementos do sangue, que resultam na cascata de coagulação e na formação do coágulo. Este atua como matriz provisória para a migração celular (Singer e Clark, 1999), auxiliada pela maior proporção de ácido hialurônico, produzido por tecido de granulação e fibroblastos teciduais (Yevdokimova e Podpryatov, 2005).

Na fase de coagulação, a plaqueta desempenha papel importante, sendo responsável pela liberação de fatores quimiotáticos que atraem outras plaquetas, leucócitos e fibroblastos. Os leucócitos atraem os monócitos e têm papel de remover o material necrótico e agentes infecciosos (Iida e Grotendorst, 1990). Os monócitos se transformam, fenotipicamente, em macrófagos, desempenhando papel de fagocitose e remoção de detritos (Newman *et al.*, 1982), liberação de fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e a formação de matriz extracelular (MEC), sendo considerados célula mestra na cicatrização (Leibovich e Ross, 1975). Apesar disso, um exacerbado infiltrado inflamatório pode ser inadequado, prejudicando a neovascularização e a formação de tecido de granulação (Luster *et al.*, 1998).

Após a coagulação e a inflamação, a reepitelização passa a ser o evento mais importante. Nessa etapa, os queratinócitos migram para o centro da ferida sob estímulo da matriz provisória de fibrina e de moléculas como as metaloproteinases, adesinas e integrinas. A hipóxia tecidual estimula a neovascularização tecidual para atender ao aporte metabólico, através da liberação de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) (Santoro e Gaudino, 2005; Packer e Fuehr, 1977).

Citocinas, fatores de crescimento (p. ex. fator de crescimento epidérmico, interleucina-1, FGF e VEGF), componentes da matriz extra celular, integrinas e quinases desempenham papel crítico nessa fase, ativando queratinócitos basais e suprabasais. Fluxos iônicos são também fundamentais para o

processo global de migração dos queratinócitos e reepitelização (Nahm *et al.*, 2004).

Durante as fases iniciais do reparo e de formação do tecido de granulação, a ferida tende a recapitular a embriogênese, produzindo mais colágeno tipo III. Já na fase de remodelação, mediado principalmente pelas collagenases, o colágeno tipo III é gradualmente substituído por colágeno tipo I, responsável por conferir à cicatriz mais estabilidade e resistência à tração (Martin e Parkhurst, 2004). Nessa fase, o ácido hialurônico é degradado pela hialuronidase e substituído por PGs sulfatados (condroitina e dermatam sulfatos), que são responsáveis pela formação do tecido de granulação tardio e conferem às cicatrizes uma menor capacidade de migração celular e maior resistência à tração (Karvinen *et.al.*, 2003).

Na última fase da cicatrização, a fase de remodelação, ocorre remoção do excesso de moléculas formadas durante a fase proliferativa. Células da ferida retornam a um fenótipo estável e o tecido de granulação, que era exuberante durante as fases iniciais da cicatrização, começa a desaparecer (Ramasastry, 2005).

Logo, a cicatrização da pele pode ser entendida como processo em que ocorre destruição celular, formação e remodelação de estruturas. É um processo biológico de alta complexidade e, devido ao processo inflamatório intrínseco, reflete, ao menos parcialmente, outras condições clínicas que são mediadas por fatores inflamatórios. Nesse contexto, entende-se que o modelo experimental de cicatrização da pele elucida princípios biológicos pertinentes a diversos processos fisiológicos e patológicos, tanto cutâneos como extracutâneos. A extrapolação de conhecimentos do tecido tegumentar para demais tecidos epiteliais, dá-se pela semelhança estrutural e por respostas fisiopatológicas. Esses indícios permitem supor que o modelo apresentado pode trazer conhecimento nos campos das ciências biológicas e biomédicas.

1.2.3 Uso de técnicas de fluorescência no exame da pele

Desde 1903, quando foi inventada a Lâmpada de Wood (LW) por Robert W. Wood (Wood, 1919), técnicas de fluorescência vêm sendo estudadas como métodos auxiliares para o exame da pele. A LW foi criada partindo-se dos princípios das propriedades de absorção e emissão de luz do tecido cutâneo. A LW emite luz UV entre 320 e 400 nm e, quando direcionada à pele, é absorvida, e luz de comprimentos de onda maiores é emitida, geralmente dentro do espectro de luz visível. A LW tornou-se uma ferramenta valiosa na prática da medicina, ao contrário de outros dispositivos médicos, que tendem a perder sua utilidade ao longo do tempo (Asawanonda e Taylor, 1999).

A melanina, hemoglobina e o colágeno absorvem luz na faixa de onda emitida pela LW e luz visível é emitida, com predomínio da luz azul. Outros fatores influenciam na fluorescência da pele, como a elastina, aminoácidos aromáticos e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (Fulton, 1997).

A LW tornou-se uma ferramenta conhecida e utilizada pelos dermatologistas como método auxiliar no exame e diagnóstico de desordens da pigmentação (hipocromias, acromias e hiperchromias); em processos infecciosos bacterianos (*Pseudomonas sp.*, *Propionibacterium acnes*, eritrasma); fúngicos (tíneas, pitíriase versicolor) e doenças que cursam com alteração do metabolismo das porfirinas, as porfirias cutâneas (Asawanonda e Taylor, 1999). Através do seu emprego, pode-se visualizar fluorescência amarelada em dentes ou na pele de indivíduos que fizeram uso de tetraciclinas, por via sistêmica ou tópica, respectivamente. Na prática diária, também pode ser empregada na identificação de componentes fluorescentes de cosméticos, medicamentos ou produtos industriais usados topicamente.

Robinson (2004) mostrou que, com o advento de técnicas de terapia fotodinâmica, a LW pode também ser estudada para auxiliar na delimitação de lesões cancerígenas. Apresentou a visualização de fluorescência mais intensa emitida pelo tecido neoplásico, quando comparada à fluorescência da pele sã

adjacente. Na sua pesquisa, confrontou os dados clínicos com estudos histopatológicos, mostrando que há uma boa correlação entre eles, corroborando a empregabilidade de métodos de fluorescência em estudo de alterações histológicas cutâneas.

O termo 'diagnóstico de fluorescência' ou 'diagnóstico fotodinâmico' é usado por alguns autores na designação de técnicas não-invasivas de estudo fotobiológico de tecido vivo. É considerado um método promissor apesar de não ser empregado de rotina. Foi relatado pela primeira vez em 1948, por Figge e colaboradores, como proposta principal de auxiliar no planejamento pré-operatório de lesões neoplásicas ou displásicas, sobretudo no que diz respeito às margens da lesão a ser ressecada, considerada uma tarefa difícil pelos cirurgiões oncológicos. De forma similar à Terapia Fotodinâmica (TF), no diagnóstico de fluorescência, o cromóforo aplicado tópica ou sistemicamente, apresenta seletividade pelo tecido alterado. Essas técnicas têm sido aplicadas a diversos órgãos, como trato urinário, gastrointestinal, respiratório e cutâneo. Os cromóforos utilizados diferem em suas propriedades farmacológicas, como absorção e meia-vida, sendo largamente estudados desde então.

Trabalhos recentes têm expandido a aplicabilidade de técnicas de fluorescência para avaliação do grau, extensão e prognóstico de doenças, bem como a monitoração de eficácia terapêutica. Como exemplo, Dobrev (2010), em sua pesquisa, concluiu que o método de fluorescência aplicado em voluntários com acne permitiu a avaliação de lesões incipientes ou invisíveis a "olho desarmado" e, por isso, pode nortear uma conduta terapêutica mais oportuna.

Recentemente, estudos de diagnósticos de fluorescência puderam correlacionar os achados de Intensidade de Fluorescência (IF) com a gravidade ou nível de invasão de tumores de pele, como o carcinoma de células escamosas, um tipo de câncer de pele que é frequente e pode levar a metástases e à morte do paciente (Kleinpenning *et al.*, 2010). Assim, com melhor avaliação do grau de extensão tumoral, o planejamento cirúrgico permite uma melhor resposta terapêutica e maiores chances de cura.

Técnicas avançadas de fluorescência têm sido estudadas, ainda, para auxiliar os exames não invasivos de diversos órgãos e tecidos. Pesquisas têm associado os princípios de fluorescência aos equipamentos de Tomografia Computadorizada (TC), propondo o termo microtomografia de fluorescência (Cong *et al.*, 2011). Esse método de grande precisão é capaz de localizar, quantificar e avaliar a distribuição de molécula com propriedades ópticas. Pesquisas com ressonância magnética também têm mostrado que os princípios de fluorescência podem ser vastamente pesquisados e aplicados, com a intenção de realizar diagnósticos mais precoces e precisos, de maneira não invasiva (Gade *et al.*, 2011).

Nesse contexto, é possível verificar que os princípios de fluorescência são valiosos e com boa aplicabilidade nas ciências biológicas e na medicina. Seu campo de pesquisa é vasto e vem sendo desenvolvido ao longo dos últimos anos, com a intenção de formar protocolos diagnósticos precisos para diversas condições clínicas. O desenvolvimento de métodos não-invasivos permite a medição não-destrutiva de atividades biológicas, in vivo e em tempo real. As vantagens dessas técnicas são: a rapidez, segurança e preservação do doente, evitando-se procedimentos invasivos quando estes são desnecessários ou adiáveis. A seguir trataremos acerca da Espectroscopia e Espectroscopia de Fluorescência (EF), técnica que aborda um dos métodos de avaliação da fluorescência presente no tecido.

1.2.4 Espectroscopia e Espectroscopia de Fluorescência

A técnica de espectroscopia tem sido estudada *in vitro* e *in vivo* para caracterização de diferentes moléculas e tipos celulares. Por este método, é possível avaliar alterações enzimáticas, mitocondriais, proliferação celular, diferenciar tecidos normais de malignos, mensurar pH, triptofano, colágeno, elastina, FAD e NAD (Mokry *et al.*, 2006). Quando o registro do espectro é baseado em uma molécula fluorescente, seja ela endógena ou exógena, dá-se

o nome de Espectroscopia de Fluorescência (EF), uma técnica diagnóstica não-invasiva (Stenquist *et al.*, 2006).

Após excitação por um feixe luminoso, as moléculas, ao retornarem ao estado de repouso, liberam esse ‘pacote de energia’. Essa liberação, quando ocorre na forma de luz, é conhecida como fluorescência. Através de aparelhagem apropriada, é possível realizar a captação dessa energia, na forma de onda eletromagnética, sendo esse o princípio básico da EF. Pela sua sensibilidade na determinação de estruturas biológicas, essa técnica tem sido conhecida como biópsia óptica (Thomsen, 1998). Devido às vantagens que lhe são conferidas, no que diz respeito a não invasividade, alta sensibilidade, obtenção dos dados em tempo real, produz ótimos resultados científicos e tem sido utilizada em diversos estudos (Andersson-Engels *et al.*, 2000; Canpolat e Mourant, 2000).

Na caracterização de material biológico, essa técnica baseia-se na interação entre a luz de excitação e o tecido em estudo, onde parte da radiação absorvida pelo fluoróforo é reemitida na forma de luz (fluorescência). Esta fluorescência pode ser avaliada qualitativamente e/ou quantitativamente, dependendo do tipo de estudo realizado. Através da distribuição espacial e temporal da molécula fluorescente, obtêm-se, em tempo real, informações como a concentração e dinâmica destas substâncias presentes no tecido (Furuzawa *et al.*, 1999).

Linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas em função dessas vantagens, principalmente, em estudos de tecidos neoplásicos (câncer), como exemplo: fluorescência de lesões tumorais da cabeça e pescoço (Chu e Chiang, 2010), do trato respiratório (Kanick *et al.*, 2010), do trato gastrointestinal (Roy *et al.*, 2010), da cavidade oral (McGee *et al.*, 2009), cânceres urológicos (Kirkpatrick *et al.*, 2005), entre outros tipos.

Eljamel e colaboradores (2008) avaliaram pacientes com câncer neuronal, dividindo-os em dois grupos. No primeiro, submeteram a técnicas tradicionais de análise por imagem; no segundo grupo, os pacientes foram submetidos à

análise da fluorescência após administração de um fotossensibilizante. O acompanhamento pós-operatório mostrou uma taxa maior de sobrevida no segundo grupo, possibilitando aos autores concluir que a análise da fluorescência pode auxiliar na avaliação do grau de acometimento do tecido neuronal pela doença, direcionando uma intervenção terapêutica mais apropriada.

No campo da urologia, Jocham e colegas (2008) relataram que o uso de um fotossensibilizador injetado na bexiga duas horas antes da cirurgia, aumenta a sensibilidade na detecção de câncer desse órgão de 84% para 97%, mostrando que a técnica apresenta um melhor desempenho no diagnóstico da afecção do que as outras técnicas de diagnóstico usadas isoladamente.

Em ginecologia, Nowakowski e colegas (2005) demonstraram a resposta do diagnóstico de fluorescência na detecção e localização de lesões vulvares e de órgãos internos do aparelho reprodutor feminino. A sensibilidade na confirmação de alterações da vulva, útero e ovário, chegou a 92%, retratando alto nível de sensibilidade dessa técnica.

É possível observar que as técnicas de espectroscopia e EF são estudadas em vários tipos de tecidos biológicos e diversas áreas do conhecimento médico, porém, seu uso é mais relevante no tecido cutâneo, devido à maior acessibilidade da pele à luz. Dessa maneira, na revisão da literatura, encontrou-se maior número de trabalhos aplicando a técnica em diversas situações que envolvem a pele, sejam elas fisiológicas ou patológicas. O real interesse desse trabalho é o estudo da fluorescência em lesões de pele, mais especificamente, no processo de cicatrização cutâneo. A seguir, apresenta-se uma revisão de trabalhos de interesse para esta pesquisa, baseando-se no estudo da fluorescência da pele com ou sem o uso de MAL.

As características ópticas da pele podem ser resumidas pelo coeficiente de difusão, absorção e reflexão. Modelos matemáticos são investigados para se relacionar a proporção de substâncias na pele, tendo como referência a curva de reflexão na espectroscopia (Bohnert *et al.*, 2008; Zonios *et al.*, 2001).

Segundo estes estudos, a composição do tecido, como a disposição, diâmetro e densidade das fibras de colágeno são capazes de alterar os coeficientes de reflexão do tecido cutâneo, dados que podem ser úteis no estudo do dano à pele e no processo de reparo da mesma.

A diferenciação entre tecidos normais e patológicos é uma das linhas de pesquisa mais estudadas através da EF com aplicabilidade biológica. Estudo, utilizando modelos animais, conduziu à avaliação das seguintes lesões: lesões de pele induzidas por UVB, lesões pré-malignas de mucosa palatina e tumores sólidos. Os espectros de fluorescência foram registrados através do uso de um corante com excitação a 600 nm e emissão entre 665-900 nm. Os resultados apresentados permitiram concluir que a técnica de EF mostra boa discriminação das lesões em tempos distintos (van Staveren *et al.*, 2001).

Em casos de melanoma cutâneo, a fluorescência do tecido tumoral foi comparada à da pele normal. Nesse estudo, foi mensurada a emissão de fluorescência do triptofano, que foi mais intensa no tumor em relação à pele normal, provavelmente, devido ao maior conteúdo celular presente no tumor. De maneira oposta, a fluorescência do colágeno apresentou-se reduzida no tumor, devido à liberação de enzimas líticas que degradam o tecido conjuntivo (Bracaleon *et al.*, 2001). Dimitrow e colaboradores (2009) fizeram a comparação dos espectros de fluorescência entre lesões de melanoma, pele sã e nevos melanocíticos benignos. Os resultados mostraram diferenças nas intensidades de fluorescência (IF) entre as lesões estudadas, concluindo que este é um método diagnóstico auxiliar e preditor de malignidade cutânea.

A psoríase também tem sido estudada por EF, como no trabalho de Gillies e colaboradores (2000). Foi encontrada, novamente, diferença significativa entre a IF da pele normal e das lesões estudadas. A hipótese, para isso, baseou-se nos achados histológicos da psoríase, como: aumento de hemoglobina local, presença de infiltrado inflamatório e proliferação da epiderme com espessamento da mesma. A pele aparentemente normal dos voluntários com psoríase também foi estudada e comparada com os voluntários

sadios. Os achados sugeriram que existem alterações dos espectros que são preditoras da psoríase, mesmo que não manifestada clinicamente. Foi proposto, nesse trabalho, que o método pode ser usado como ferramenta adicional para avaliar o índice proliferativo da pele e, portanto, tornar-se um marcador de atividade da doença e de avaliação da resposta terapêutica.

A aplicação de conhecimentos de espectroscopia também já foi reportada na literatura médico-legal no estudo cronológico de lesões equimóticas (Payne *et al.*, 2007) e queimaduras (Randeberg *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2007). O edema cutâneo também foi estudado, levando-se em consideração a proporção de água no tecido. Sabe-se que a água está envolvida em todos os eventos biológicos, inclusive no processo de cicatrização. A habilidade de reparo a injúrias foi avaliada, baseando-se no registro da fluorescência nativa da pele (Stamatas *et al.*, 2006).

Navarro e colegas (2004) propuseram o estudo da cicatrização de feridas através de microscópio de emissão de fótons, com a consequente emissão de fluorescência pelos cromóforos naturais da pele, com comprimentos de onda específicos já determinados. O colágeno é excitado com comprimento de onda na faixa de 280-320 nm e emite fluorescência entre 350-420 nm; já a elastina, absorve entre 340-370 nm e emite na faixa de 400-450 nm. O trabalho permitiu a conclusão de que se trata de método não destrutivo de análise do colágeno, da angiogênese e dos processos de inflamação e cicatrização.

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seus derivados ésteres são moléculas com princípios fotoativos e, por isso, vêm sendo estudados nas últimas décadas em Terapia Fotodinâmica (TF) e na caracterização dos tecidos *in vivo* (Andersson *et al.*, 1987; Kennedy *et al.*, 1996; Svanberg *et al.*, 1998; Zellweger *et al.*, 2001). ALA é um composto endógeno que participa da síntese do heme e, em excesso, leva ao acúmulo intracelular da protoporfirina IX (Angell-Petersen *et al.*, 2007) que pode ser ativada com luz visível (Juzenas *et al.*, 2002b). Isto pode ocorrer devido à incapacidade de transferência dessa

substância à mitocôndria (Peng *et al.*, 2001), já que em estados fisiológicos esse fenômeno não é observado (Juzeniene *et al.*, 2006).

A concentração da protoporfirina IX é mensurada através da EF baseando-se no comprimento de onda que ela emite. Sabe-se que a mesma é ativada por luz de comprimentos de onda na faixa de 400 a 410 nm e emite fluorescência em dois picos, um na faixa de 630-40 nm e o outro na faixa de 700-10 nm (Zellweger *et al.*, 2001; Juzenas *et al.*, 2002b).

A distribuição e localização do ALA e seus derivados na pele se faz de forma heterogênea e têm sido foco de estudo. Os ésteres derivados do ALA são relatados como mais lipofílicos e com maior poder de penetração no tecido cutâneo (Juzeniene *et al.*, 2006). Estudos realizados por De Bruijin e colaboradores (2008), utilizando imagem de fluorescência da pele após aplicação tópica de ALA e seu derivado MAL, mostraram intensidade de fluorescência em todas as camadas da pele, com níveis de intensidade significativamente maior no estrato córneo e estruturas anexiais da derme.

No estudo de De Bruijin e colaboradores (2008), a IF foi confrontada com imagens microscópicas. A fluorescência da PpIX foi observada com intensidades variadas, de acordo com a região da pele. Nesse trabalho, houve uma relação estreita entre a localização da fluorescência e citoplasmas das células epidérmicas e dérmicas, explicando a baixa fluorescência em geral encontrada na derme, já que esta camada é formada principalmente por estruturas acelulares, como as fibras colágenas, elásticas e MEC.

Estudos diversos compararam, ainda, a fluorescência da pele normal com a fluorescência apresentada em lesões pré-malignas e malignas da pele, como ceratose actínica e carcinoma baso-celular, respectivamente (Svanberg *et al.*, 1998; Wennberg *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Sharfaei *et al.*, 2002; Juzenas *et al.*, 2002a). Em todos esses trabalhos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores de IF emitida pela lesão de pele e a área adjacente normal.

Segundo Juzenas e colaboradores (2002b), a IF da PpIX em geral encontrada nas áreas de lesão de pele é maior do que na pele normal. O exato mecanismo que explicaria esse fato ainda não foi elucidado, porém, algumas teorias sugerem que a região afetada da pele apresentaria uma combinação de alterações metabólicas. Baixos níveis ou baixa atividade de algumas enzimas envolvidas na síntese do heme como a ferroquelatase, baixa concentração de íons intracelulares e alta atividade do porfobilinogênio deaminase (Juzenas *et al.*, 2002-a). Além disso, tem sido proposto na literatura que o estrato córneo dos tecidos alterados apresentaria uma maior permeabilidade ao ALA e seus derivados (Moan *et al.*, 1999).

Portanto, pode-se dizer que a técnica de EF mostra-se promissora na caracterização tecidual, podendo ser aplicada no estudo de diversas propriedades biológicas. O uso dos conhecimentos físicos e químicos no campo das ciências biomédicas é um tópico recente, constituindo-se, pois, num campo de pesquisa a ser explorado. Algumas informações parecem discordantes, em função da falta de um protocolo comum de pesquisa e da adoção de modelos e métodos não-reprodutíveis. A iniciativa do uso da EF como método de diagnóstico não-invasivo tem mostrado resultados positivos, porém, há poucos estudos a respeito e, conseqüentemente, há muito que se investigar até o estabelecimento de protocolos otimizados. Assim, tendo em consideração as evidências, o presente trabalho fundamenta-se na necessidade de estudos mais precisos e sistemáticos sobre métodos de avaliação/ diagnósticos não-invasivos, com ênfase no processo de cicatrização da pele e suas correlações histológicas. A revisão da literatura a seguir, trata da técnica de análise histológica quantitativa proposta nesse trabalho, a estereologia.

1.2.5 Estereologia geral e do tecido cutâneo

A necessidade de produzir dados quantitativos confiáveis sobre os componentes dos tecidos estimulou o desenvolvimento e o uso de métodos estereológicos nas ciências biológicas (Weibel e Fleischner, 1979). A Estereologia pode ser definida como um conjunto de ferramentas geométricas e estatísticas que permitem obter informações sobre estruturas em plano tridimensional (3-D) a partir da análise de imagens planas bidimensionais (2-D), como as obtidas em cortes histológicos para a microscopia de luz. Desse modo, medindo-se parâmetros em cortes de tecido (2-D), podem-se extrapolar informações sobre as estruturas no plano 3-D, proporcionando uma melhor compreensão da morfologia *in vivo*. Além disso, os dados são analisados por princípios quantitativos, em contraste com os dados qualitativos, obtidos pelas técnicas de imagem mais comuns (Kamp *et al.*, 2009).

Na medicina e na biologia, a estereologia pode ser usada para estimar características tais como: volume celular, área de superfície de membrana, comprimento de vasos sanguíneos e número total de células. A estereologia estima, ainda, densidades: densidades de volume (V_v); densidade de comprimento (L_v); densidade de superfície (S_v); densidade numérica (N_v); densidade de área (A_A) e densidade numérica por área (N_A ou Q_A) (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

A estereologia se baseia no princípio formulado em 1847 pelo geologista francês August Delesse: “A densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual à densidade das áreas destes componentes que aparecem em cortes representativos feitos ao acaso”. Por este princípio, pode-se afirmar que:

$\frac{\text{Área do componente}}{\text{Área da rocha}} = \frac{\text{Volume do componente}}{\text{Volume da rocha}}$

Ou seja: $A_A = V_V$

As medidas estereológicas somente serão válidas se as amostras forem representativas do tecido e randomicamente selecionadas. Para uma boa realização da técnica, é necessário haver um planejamento inicial dos cortes histológicos, baseando-se, fundamentalmente, nas características biológicas do tecido a ser estudado. Dois tipos de cortes histológicos são frequentemente mencionados na estereologia: Isotrópicos Uniformes Randômicos (IUR) e Verticais Uniformes Randômicos (VUR). O primeiro tipo de corte, só pode ser aplicado a materiais isotrópicos, ou seja, com distribuição homogênea de estruturas, como uma esfera, por exemplo. O tecido pulmonar e hepático são exemplos de tecidos biológicos que podem ser estudados através de cortes IUR, onde seções são preparadas aleatoriamente quanto à orientação espacial.

As estruturas biológicas geralmente não são homogêneas, apresentando variações regionais, não sendo, portanto, isotrópicas, demonstrando variância de acordo com a orientação do tecido. Em outras palavras, esses tecidos são chamados anisotrópicos e, diferentemente dos isotrópicos, possuem um eixo preferencial de orientação. Nesses tecidos, um eixo é determinado de forma não aleatória pelo pesquisador e estabelecido para todos os demais cortes da pesquisa. No caso da pele, é prático escolher um eixo vertical que é perpendicular à superfície externa da pele e, assim, preparar cortes onde a epiderme seja visualizada sobre a derme, como é feito tipicamente na rotina dos dermatopatologistas (Kamp *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, a orientação do corte no eixo vertical deveria ser determinada aleatoriamente de forma que qualquer direção tivesse a mesma chance de ser escolhida (Gundersen e Osterby, 1981). Porém, mais recentemente, estratégias virtuais têm sido desenvolvidas e utilizadas para assegurar a amostragem aleatória quanto ao eixo vertical, eliminando-se, a necessidade de girar a amostra aleatoriamente em torno do eixo vertical antes

do corte. Desse modo, o pesquisador pode escolher, também, o eixo vertical mais conveniente para visualizar as estruturas de interesse. Este avanço tecnológico permitiu que materiais originalmente confeccionados para outras técnicas de análise, pudessem ser estudados através de métodos estereológicos. Após definição do eixo vertical, deve-se ter o cuidado de emblocar corretamente o material, de forma que o micrótomo faça cortes seriados perpendiculares à epiderme e, portanto, paralelos entre si e ao eixo vertical estabelecido.

Após a determinação do eixo vertical, o primeiro corte é realizado no material e, a partir de então, vários cortes consecutivos são feitos com intervalo constante predeterminado. Dessa maneira, uma vez que o primeiro corte é VUR, os cortes subsequentes também serão. Através de um sistema composto por microscópio, câmera fotográfica e microcomputador, imagens dos cortes podem ser obtidas para iniciar a análise do tecido. No processo de leitura das lâminas, vários parâmetros podem ser avaliados e estudados pelo pesquisador, estabelecidos de acordo com a necessidade e o objetivo da pesquisa. Pode-se obter informações sobre número, comprimento, área e volume das estruturas, empregando-se regras simples para a contagem. As mensurações são realizadas nos cortes, tendo-se como base, o perfil bidimensional dos componentes de interesse e, antes de iniciar a contagem, é indispensável que sejam determinadas quais medidas são importantes e fundamentais no estudo.

Quando várias medidas são realizadas, corre-se o risco de avaliar-se apenas a razão entre duas estruturas o que pode levar a possíveis conclusões equivocadas. Se houver um aumento ou redução proporcional entre as duas estruturas avaliadas, a razão não sofre modificação, gerando a falsa conclusão de que não houve alteração. Por isso, é importante que sejam sempre realizados cálculos de valores absolutos, permitindo valores mais fidedignos e indubitáveis. Para calcular-se o volume de qualquer objeto, pode-se utilizar o método de Cavalieri o qual, no século XVII, demonstrou que o volume do objeto pode ser estimado se este for seccionado em fatias paralelas, de mesma

espessura e equidistantes. A seguir, somam-se todas as áreas de todas as fatias do objeto e multiplica-se este resultado pela distância conhecida entre os cortes.

A área dos transsectos pode ser facilmente obtida pelo método de contagem de pontos, no qual um sistema teste de pontos é sobreposto à imagem e os pontos incidentes sobre as estruturas de interesse são contados (ex: lesão, epitélio, derme). Cada ponto (pt_{obj}) que atinge o tecido está associado a uma dada área, ou área do ponto ($a_{(pt)}$); sendo, portanto, a área total representada pela fórmula a seguir:

$$A_{obj} = \sum pt_{obj} \times a_{(pt)}$$

e, portanto, o volume, segundo Cavalieri, pode ser estimado a partir da área do objeto, aplicando-se a fórmula:

$$VT_{obj} = \sum pt_{obj} \times a_{(pt)} \times T$$

onde pt_{obj} são os pontos incidentes sobre a lesão em cada corte avaliado; $a_{(pt)}$ é a área associada ao ponto, determinada pelo sistema teste que será aplicado e T , a distância conhecida entre os cortes.

O objetivo final da estereologia é o cálculo do volume, pois é um parâmetro com maior significância e representatividade biológica. Através dele, pode-se empregar o estudo de regiões anatômicas, populações celulares, envelhecimento e em diferentes condições fisiológicas e patológicas como atrofia e hipertrofia teciduais. Diversos estudos comparativos empregam o método para estudar estruturas e funções em seres vivos, vertebrados e invertebrados (Mouton, 2002).

A estereologia tem sido amplamente aplicada a diversas condições clínicas no campo da Dermatologia, como em estudos de quantificação de fibras elásticas e colágenas (Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 1989), células de

Langerhans (Bauer *et al.*, 2001), infiltrado inflamatório linfocítico (Ellingsen *et al.*, 2001), espessura da epiderme (Bruengger *et al.*, 1984), vasos linfáticos (Hern *et al.*, 2005), dentre outros estudos em alterações fisiológicas ou patológicas.

Essa técnica tem sido aplicada em estudos do tecido tegumentar, com destaque no campo das neoplasias e processos de cicatrização da pele e na formação de cicatrizes (Kamp *et al.*, 2009). Na cicatrização, estudos comparativos são empregados para quantificar diversas estruturas teciduais, como: fibroblastos e colágeno (McGaw e Ten Cate, 1983; Ricketts *et al.*, 1999; Brahmawari *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2008), vascularização tecidual e vasos neoformados (Khozani *et al.*, 2004; Amadeu *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2008), matriz extracelular (Burugapalli e Pandit, 2007), infiltrado celular inflamatório e epitelização (Garcia *et al.*, 2008).

Revisando a literatura, é possível observar que já foram realizados vastos estudos de EF e de estereologia na caracterização do tecido cutâneo. Porém, para o nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que se propõe a estudar a EF na cicatrização da pele, fazendo-se a correlação com os achados qualitativos e quantitativos das estruturas teciduais. Ressalta-se, ainda, que são escassos os trabalhos de cicatrização da pele que utilizaram a estereologia como método quantitativo.

Dessa forma, dada a escassez de trabalhos que procurem correlacionar os achados histológicos aos achados de fluorescência (Wetzig et al., 2010) e a grande importância da técnica de estereologia na caracterização e quantificação das estruturas biológicas teciduais, essa técnica torna-se aplicável e relevante ao processo de reparo da pele, contribuindo no conhecimento e enriquecimento do tema e, sobretudo, elucidando condições histológicas que possam estar correlacionadas aos dados da espectroscopia de fluorescência, técnica em aplicação nesse protocolo.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é fornecer subsídios para responder às seguintes questões:

- “a espectroscopia de fluorescência utilizando MAL permite diferenciar a pele normal da pele em cicatrização?”
- “é possível diferenciar lesões cicatriciais recentes das lesões tardias através da utilização desse método?”
- “é possível estimar a idade da lesão cicatricial através do método proposto?”
- “existe um padrão histológico e estereológico que corresponda aos achados de espectroscopia de fluorescência?”

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Com base nos objetivos apresentados e nos achados da literatura científica, buscou-se a metodologia para esse estudo, com a realização em 3 etapas. Na 1ª etapa, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para produção de ferida na pele. Na 2ª etapa, foi realizada a captação dos valores de fluorescência cutânea através da técnica de Espectroscopia de Fluorescência. Durante essa etapa, foram coletados fragmentos de pele para microscopia. Na 3ª etapa, foram realizados cortes histológicos a partir dos materiais emblocados em parafina e congelados em nitrogênio líquido. Os itens a seguir mostram detalhes das técnicas utilizadas.

3.2 Amostra utilizada

Foram utilizados 72 camundongos machos, gênero *Mus musculus*, linhagem *hairless*, adultos, entre 8 e 10 semanas, com peso corporal médio de 25g. Os animais foram fornecidos pelo centro de produção de animais do biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e transferidos para o setor de experimentação animal, onde permaneceram por uma semana de adaptação antes do início dos experimentos. Os animais foram alojados sob condições naturais de iluminação e temperatura e alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo referente à pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise

de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CAPPesq (Anexos A e B).

3.3 Grupos estudados e periodicidade das análises

Os animais foram divididos em 2 (dois) grupos: grupo experimental e grupo controle. O grupo experimental participou da coleta por espectroscopia de fluorescência com aplicação prévia de creme com metil-aminolevulinato (MAL) a 16%; enquanto que os demais, pertencentes ao grupo controle, foram submetidos às coletas dos valores de fluorescência sem aplicação prévia da medicação. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Considerando-se o dia da cirurgia como o dia zero, os animais foram avaliados por EF e sacrificados em grupos, em cada tempo experimental: 2, 5, 8, 11, 14, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 76 dias após a lesão. Estes dias foram escolhidos por corresponderem a diferentes fases do processo de cicatrização.

3.4 Procedimento cirúrgico

3.4.1 Técnica operatória

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de experimentação do biotério do IQ-USP. Cada cirurgia ocorreu sobre bancada térmica (+/- 37 °C), coberta com campo cirúrgico estéril descartável e com troca de material cirúrgico para cada espécime. Os animais foram anestesiados por inalação espontânea de O₂ e isoflurano (1-2%). A anestesia do animal foi verificada por teste de reflexo por compressão da pata. A antisepsia foi realizada com Cloridrato de Clorexidina 2% incluindo a pele ao redor e foi colocado um campo cirúrgico fenestrado estéril. Foi produzida uma ferida incisa de 1 cm de extensão, disposta em sentido transversal no dorso dos animais, a 1 cm da cauda, atingindo a hipoderme. O corte cirúrgico foi realizado com tesoura

cirúrgica, auxiliada com pinça de *Adson Brown*. A medição do tamanho do ferimento foi realizada com paquímetro. Com seringa descartável de 3 mL, foi feita irrigação do sítio operatório com soro fisiológico a 0,9% e posterior hemostasia com gaze estéril. A pele foi imediatamente suturada em pontos simples, com fio de nylon preto número 6-0, auxiliada por porta-agulha Mayo Hegar e pinça *Adson Brown*. Após sutura, a região foi limpa e aplicação de xilocaína gel 2% como analgesia pós-operatória. Durante o período anestésico dos animais, foi feita a identificação dos mesmos com marcadores de orelhas e colocado xilocaína 2% no local como analgesia. Os animais foram acompanhados até a recuperação completa da anestesia e colocados nas gaiolas.

3.4.2 Cuidados especiais durante o procedimento cirúrgico

Durante a cirurgia, foram asseguradas normas de assepsia e tomou-se o cuidado de minimizar a quantidade de sangue coagulado no ferimento. O coágulo, além de ser possível fator de complicação pós-operatória, como deiscência e infecções do sítio operatório, é constituído principalmente por hemoglobina, que absorve luz visível, o que poderia minimizar o sinal da fluorescência coletado (Mokry *et al.*, 2006). Dessa maneira, no sítio operatório, foi feita irrigação exaustiva com soro fisiológico e hemostasia com gaze estéril. Ainda durante o procedimento cirúrgico, os animais foram identificados e suas gaiolas foram marcadas, para que cada animal tivesse identificação própria e pudesse ser acompanhado individualmente.

3.5 Espectroscopia de Fluorescência

3.5.1 Sistema de aquisição e coleta da fluorescência

Foi montado sistema constituído por fonte luminosa de excitação a 405nm (LED azul - Figura 1a) e aparelho *Ocean Optics* acoplado a sonda coletora da fluorescência (Figuras 1b e 1c). O sinal coletado durante a aferição foi digitalizado e processado por um *software* (*SpectraSuite*) que produziu um gráfico no monitor do microcomputador acoplado ao aparelho *Ocean Optics* por meio de uma conexão USB. A aplicabilidade desse instrumental e os parâmetros do *software* foram testados antes do início desse experimento, em estudo piloto. Os protocolos determinados para otimização das coletas foram mantidos durante todos os experimentos.

Figura 1 - a) LED azul (emissão de luz a 405 nm); b) Aparelho *Ocean Optics* com conexão USB para o microcomputador; c) Detalhe do aparelho *Ocean Optics*, mostrando o orifício da sonda coletora do espectro de fluorescência.

3.5.2 Captação da Espectroscopia de Fluorescência

3.5.2.1 Técnica de captação

Durante a coleta dos espectros de fluorescência, os animais foram transportados em gaiolas fechadas com microisoladores do Biotério do IQ-USP até o Laboratório de Processos Fotoinduzidos e de Interfaces (LPFI) do mesmo Instituto e, ao chegarem ao laboratório, permaneciam por uma hora em repouso antes que fossem iniciadas as atividades experimentais programadas.

No laboratório de experimentação (LPFI), os animais eram anestesiados com Isoflurano 1-2% e oxigênio em quantidades suficientes para a minimização da movimentação do animal. Na sequência, os ferimentos eram avaliados e fotografados sistematicamente, com câmera fotográfica comum, sendo, para cada animal, realizada uma foto macroscópica e outra com lente de aumento de 20 X (dermatoscópio *DermLite PRO-HR®*) acoplada à câmera fotográfica. Durante o período de anestesia, os animais recebiam, topicamente, uma fina camada (aproximadamente 1,0 mm de espessura) de MAL 16% em creme sobre o corte cirúrgico e pele adjacente. Sobre a região, foi colocado curativo de Tegaderm® em tamanho suficiente para cobrir a região da pele a ser estudada. Após essa etapa, os animais permaneciam em sala com baixa luminosidade, pelo período de 2 h.

Após as 2h de incubação da droga, a mesma era removida com gaze umedecida com SF 0,9 % e, então, era iniciada a coleta propriamente dita dos valores de fluorescência. Os animais eram anestesiados com isoflurano inalatório 1-2% e O₂ e seguia-se a iluminação da região estudada com LED azul (405nm) e captação da fluorescência emitida através de sonda conectada ao computador (Figuras 1b e 1c). Para cada animal, procedia-se a coleta de fluorescência correspondente à lesão cirúrgica e à pele sã adjacente. A sonda foi posicionada perpendicular em relação à superfície da pele dos animais, a uma distância aproximada de 1 cm.

O grupo controle foi submetido ao procedimento de coleta da fluorescência, porém, sem aplicação tópica da droga. Em ambos os grupos, durante a coleta dos espectros, observou-se variabilidade da IF em relação ao ponto de coleta. Por essa razão, para reduzirmos erros de medida, coletamos 3 valores de fluorescência para cada sítio em cicatrização e pele sã adjacente e calculamos a média das intensidades coletadas para cada conjunto de pontos analisados.

3.5.2.2 Especificações da técnica de coleta de fluorescência

A anestesia durante a EF foi realizada com a intenção de reduzir a movimentação do animal, na tentativa de minimizar erros de coleta. Por isso, baixas doses de anestésico foram utilizadas durante curto período, cerca de 1 minuto/ animal, tempo suficiente para coleta dos valores desejados. O tempo de “incubação” da droga foi estipulado em 2 horas baseando-se na revisão da literatura que refere como o tempo necessário para o pico de produção da protoporfirina IX após aplicação tópica de MAL (van den Akker *et al.*, 2000; Bugaj *et al.*, 2006). Após a aplicação de MAL, os animais permaneciam em sala com baixa luminosidade com o intuito de reduzir ação fotoinduzida antes da coleta da fluorescência. O curativo utilizado, Tegaderm®, apesar de não ser opaco à luz, foi aplicado com intuito de otimizar a absorção percutânea da droga e evitar que os animais manipulassem o local, o que causaria remoção da medicação aplicada. Após retirada cuidadosa do curativo, a região era limpa para remoção do creme, para evitar: a) interferências na coleta dos espectros de fluorescência e b) ação da droga após o experimento.

Durante a espectroscopia, foi utilizada fonte de excitação de 405nm (LED azul). O critério de escolha foi baseado no espectro de absorção da protoporfirina IX, principal componente em avaliação nesse estudo (Zellweger *et al.*, 2001; Juzenas *et al.*, 2002b). Durante os experimentos pilotos, foi determinada a distância e posição da sonda em relação à pele dos animais.

Viu-se que perpendicularmente e a 1,0 cm de distância, os valores de fluorescência coletados eram otimizados (picos de emissão da protoporfirina IX - 633nm e 703nm), em concordância com outros trabalhos (Bugaj *et al.*, 2006; Kirkpatrick *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2001).

Quanto às condições de iluminação do ambiente no qual o experimento foi realizado, reduziu-se a iluminação natural e artificial com o intuito de diminuir possíveis interferências externas nos espectros coletados durante o estudo. A luminosidade natural foi minimizada por uso de cortinas pretas e a luminosidade artificial era eliminada por dispositivos comuns de eletricidade, os interruptores. Cabe destacar que a sala de experimentação permanecia escura durante toda a coleta dos valores de fluorescência.

O software *SpectraSuite®*, responsável pela codificação do espectro emitido, foi calibrado em suas principais funções e esses parâmetros foram mantidos durante todos os experimentos na intenção de reduzir erros, uma vez que a confiabilidade dos dados espectrais depende, em grande parte, dessa calibração. O *software* faz a aquisição dos espectros e mostra-os no microcomputador, exportando-os no formato *SCOPE*, facilitando o processamento posterior o qual foi realizado no *software Origin®*, versão 7.0.

Para evidenciar a emissão da fluorescência pela PpIX, optou-se por calcular a área do espectro compreendida entre 580 e 800 nm, descartando-se a janela espectral abaixo de 580 nm e acima de 800 nm. Nestes intervalos de onda, há emissão de fluorescência decorrente à presença de fluoróforos endógenos como elastina, NADP e colágeno; os quais não foram abordados nesse trabalho. Portanto, para explanação dos dados, calculou-se a média da fluorescência para cada dado de coleta através da área correspondente ao intervalo entre 580 e 800nm, conforme mostrado na área sombreada a seguir (Figura 2).

Figura 2 - Área sombreada representativa do intervalo de emissão de fluorescência da PpIX, facilmente obtida através do programa *Origin® 7.0*. Os valores numéricos correspondentes são obtidos em tempo real e armazenados para cálculos e comparação estatística entre os diferentes sítios de coleta, grupos e tempos avaliados.

3.6 Coleta, processamento e análise dos fragmentos de pele

3.6.1 Coleta dos fragmentos de pele

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 3.4 e acompanhados nos 3 primeiros meses de pós operatório. No biotério do IQ-USP, nos dias correspondentes aos experimentos, animais de ambos os grupos (experimental e controle) foram eutanaziados em câmara de CO₂ para remoção da lesão no dorso dos mesmos. Após verificada a morte do animal e sobre uma bancada do biotério, procedeu-se a remoção cuidadosa de todo o ferimento com uma margem lateral de 5 mm e, em profundidade, atingindo o tecido subcutâneo, fazendo-se, quando necessário, a remoção de aderência a planos profundos. A remoção foi feita com tesoura cirúrgica com auxílio de

pinça de *Adson Brown*. Os fragmentos de tecido foram separados e processados para microscopia convencional e de fluorescência. As carcaças dos animais foram descartadas segundo as normas do grupo de gerenciamento de resíduos descritas na cartilha de orientação para descarte de resíduos no sistema HC-FMUSP.

3.6.2 Processamento do material

As etapas de processamento dos materiais, confecção e análise das lâminas histológicas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LIM-59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Foram realizados dois processamentos distintos nos materiais: a) para análise no microscópio convencional (de luz, microscopia óptica) e b) para análise por microscopia de fluorescência. As etapas referentes aos processamentos serão descritas a seguir.

3.6.2.1 Microscopia óptica

Após exame macroscópico local, as peças operatórias foram adaptadas em papel filtro para evitar torções, identificadas e imediatamente mergulhadas em formalina a 10% em tampão fosfato de sódio por 24h a temperatura ambiente. Essa etapa permitiu melhor fixação e conservação do tecido, evitando alterações *post mortem*. Após esse período, foram transferidos para álcool etílico a 70% onde foram mantidas até o momento da inclusão em parafina. Para inclusão em parafina, o tecido foi desidratado em concentrações sucessivas de álcool etílico (90%, 95% e 100%, 30 minutos em cada); diafanizados em xilol (3 passagens de 15 minutos cada), embebidos em parafina líquida por 2 horas em estufa a 60 °C.

3.6.2.1.1 Inclusão e corte do material

Para obtenção dos dados morfométricos, foram aplicadas técnicas de estereologia, de modo a obter informações quantitativas de forma simples, eficiente, precisa e imparcial, ou seja, sem vício ou tendência (Gundersen e Osterby, 1981). Os procedimentos descritos a seguir são indispensáveis para garantir a eficiência e a imparcialidade da técnica estereológica.

Uma vez que existe uma orientação preferencial para a observação da lesão ao microscópio, necessitou-se obter cortes histológicos que passassem transversalmente ao maior eixo da lesão, atingindo todas as camadas da pele, da superfície até a profundidade. Devido à estrutura estratificada da pele, foram utilizados, nesta análise, cortes verticais e o método de amostragem uniforme, sistemático e randômico (Kamp *et al.*, 2009, Gundersen *et al.*, 1988). Para tanto, definiu-se como eixo horizontal o maior eixo da lesão, como indicado na Figura 3. Assim, para a obtenção de cortes verticais, ou seja, perpendiculares ao eixo horizontal, os materiais foram emblocados em parafina de maneira que o maior eixo da lesão estivesse perpendicular à face de corte do bloco.

Os blocos foram mantidos sob refrigeração em geladeira por 2 horas, até endurecerem e conferirem maior precisão de corte. Cortes sequenciais de 5 *micra* cada, foram realizados com auxílio de um micrótomo rotatório (LEICA RM2245) em intervalos de 600 *micra* até o esgotamento do tecido. Assim, foi possível obter uma boa amostragem de lâminas para cada bloco de parafina analisado, ou seja, para cada animal. Já que o eixo horizontal estabelecido foi coincidente ao maior eixo da lesão da pele, as fatias obtidas de acordo com esse plano foram paralelas entre si, portanto, a partir da primeira fatia, todas as demais foram correspondentes a cortes transversais.

Figura 3 - Representação esquemática do procedimento de inclusão e amostragem do tecido para o estudo estereológico. Em vermelho é representada a lesão produzida nos animais que, ao longo dos cortes, apresenta diferentes dimensões, devido ao formato elíptico da lesão incisa.

Os cortes histológicos seriados de 5 *micra* de espessura foram obtidos e distendidos em lâmina de vidro e lâminas silanizadas para microscopia convencional e imunoistoquímica, respectivamente. As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos, para garantir uma análise cega. As lâminas foram colocadas em estufa a 60 °C para remoção do excesso de parafina aderida à mesma (desparafinizados), para depois serem coradas e processadas pelos métodos:

→ Hematoxilina-eosina

Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina para estudo histológico geral, por ser esta uma coloração clássica para identificação histopatológica de rotina. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e submetidos à solução de *Hematoxilina* de *Harris* por 5 minutos e rapidamente lavados em água corrente. Posteriormente, foram colocados em água amoniacal e lavados em água corrente e álcool a 95%. As lâminas foram, então, contra-coradas com solução de *Eosina* a 1% durante 2 minutos e lavadas em água corrente. Após esse procedimento, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínula para análise ao microscópio óptico.

→ Picrosírius-hematoxilina

Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e corados durante uma hora com *sirius red* 0,1% (*sirius red* f3b200, Mobay Chemical, New Jersey, EUA) dissolvidos em solução aquosa saturada de *ácido pícrico* sendo, em seguida, lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris, por 5 minutos (Junqueira *et al*, 1979). Para facilitar a citação desta coloração, será usado o termo *Picrosírius* ao longo do texto, ao invés de Pricrosírius-hematoxilina.

Pelo método de *Picrosírius*, além da identificação do colágeno por coloração vermelha intensa quando analisado sob a luz convencional; é possível realizar a avaliação qualitativa quanto à agregação das suas fibras, quando analisamos as lâminas sob a luz polarizada, conforme o método descrito por Junqueira e colegas (1979). O colágeno assume intensidade de birrefringência variada, resultante dos diferentes graus de agregação física das suas fibras. Dessa forma, fibras delgadas, como as presentes no tecido de granulação jovem, são reveladas como estruturas esverdeadas fracamente refringentes, enquanto as fibras mais espessas, que caracterizam lesões fibróticas maduras, definem-se por sua forte refringência de coloração amarelada a avermelhada.

→ Imunoistoquímica marcada com PCNA:

Para o estudo imunoistoquímico, os cortes de 5 µm, recolhidos em lâminas silanizadas, foram desparafinizados e hidratados. O processo de desparafinização foi feito ao colocar as lâminas em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4 (PBS). O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada em alta temperatura em solução de *ácido cítrico* 10 mM pH 6,0, em panela a vapor a 125°C por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10 v(3%), que foi posteriormente removida com água corrente, água destilada e tampão fosfato salino (PBS). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em caseína por 5 minutos na temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com o PCNA 1:100 diluído em 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 24 horas a 4 °C e, em seguida, incubados com o anticorpo secundário Vector (*Vectastain Elite ABC-kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA Linaris*) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha*). Posteriormente ocorreu a contracoloração com *Hematoxilina de Harris* (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) para todos os casos.

3.6.2.2 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada com intenção de auxiliar no entendimento da fluorescência apresentada na pele dos animais. O estudo avaliou a distribuição da PpIX na pele dos animais do grupo experimental, ou seja, após aplicação de MAL na forma de creme. Além disso, foram realizados cortes histológicos sem a incubação prévia com MAL, para ser avaliada a distribuição da autofluorescência tecidual.

Buscou-se na literatura a metodologia para realização dessa técnica (Sharfaei *et al.*, 2002; De Rosa *et al.*, 2004; De Bruijin *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2001; Dognitz *et al.*, 2008; Ninomiya *et al.*, 2001). Os materiais foram removidos conforme descrito no item 3.6.1 e colocados em *ependorf* com *tissue tec* no interior em quantidade suficiente para cobrir a peça. Seguiu-se a identificação dos frascos e proteção com papel alumínio; sendo, os mesmos, colocados em recipiente contendo Nitrogênio (N₂) líquido. Os materiais foram armazenados em *freezer* -70/ -80 °C no IQ-USP antes da confecção dos cortes de congelação. Para melhor conservação do material, após coleta dos fragmentos nos tempos experimentais, os mesmos foram transportados em *isopor* com gelo seco até o Departamento de Patologia na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde foram submetidos aos cortes (10 µm cada). As lâminas foram transportadas em *isopor* com gelo seco para o laboratório no IQ-USP (LPFI) para análise no Microscópio de Fluorescência.

3.6.3 Análise das lâminas

3.6.3.1 Análise bidimensional e tridimensional (estereologia)

Um corte histológico corado com HE, de cada um dos intervalos de 600 *micra*, foi usado para cálculo dos volumes das estruturas analisadas na pele dos animais, tais como: coágulo, infiltrado inflamatório, camada córnea, epiderme, derme e anexos. Foram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos na região correspondente à lesão em cicatrização, utilizando objetivas capazes de capturar toda a região a ser analisada (2,5 X; 4 X ou 10 X), incluindo a transição com o tecido preservado. Para captação da imagem, utilizou-se um sistema composto por um microscópio *Nikon eclipse e600* acoplado a uma câmera de vídeo digital *Nikon DXM1200f* e um microcomputador. Foram obtidas imagens em alta resolução com auxílio do

programa ACT-2U® *Nikon Corporation*, software instalado no microcomputador acoplado.

A seguir, as imagens obtidas foram transferidas para o programa *Image J®*, do *National Institute of Health* (USA), para facilitar o armazenamento e processamento dos dados. Antes da contagem e medição das estruturas da lesão, foi tomado o cuidado de realizar calibração do tamanho/ resolução da imagem baseando-se no aumento da objetiva utilizada para captura da mesma.

Pelo programa *Image J®*, e segundo Papadopoulos e colegas (2007), procedia-se a mensuração da espessura (2-D) das camadas córnea, epidérmica, dérmica e das estruturas anexiais. A mensuração da espessura (2-D) foi conduzida pelo método de interceptos ortogonais. Neste método, aplica-se um sistema teste de linhas paralelas e equidistantes sobre a imagem para gerar os pontos onde as mensurações serão conduzidas (Figura 4).

Figura 4 - Representação da técnica de interceptos ortogonais (Garcia *et al.*, 2008), utilizada para determinar a medida de espessura (2-D). Essa imagem mostra linhas amarelas que exemplificam pontos de estimativa da espessura epidérmica. O mesmo procedimento pode ser realizado para a mensuração da espessura de outras estruturas da pele.

Após aferição das espessuras, ou seja, das medidas bidimensionais (2-D) um retículo ou *gride* de pontos era sobreposto às imagens. A contagem dos pontos incidentes era realizada respeitando os limites da lesão, considerando-se uma estreita borda em reparação. Foram contados os pontos que incidiram sobre as principais estruturas visualizadas nos cortes histológicos da pele, tais como: coágulo, infiltrado inflamatório, camada córnea, epiderme, derme e anexos (Figura 5). Os números correspondentes a essa contagem eram armazenados pelo programa *ImageJ*® e, posteriormente, exportados para o *Microsoft Excel*® para confecção de planilha dos dados e aplicação das fórmulas para cálculo dos volumes correspondentes.

Figura 5 - Representação esquemática do “gride” para contagem dos pontos incidentes. Nessa etapa de leitura das lâminas, os pontos, assinalados em azul, são contados ao longo da lesão e das suas bordas. Os dados são armazenados para cálculos de volume das estruturas contadas.

Para o estudo quantitativo do volume das estruturas tegumentares, foram considerados os pontos contados separadamente para cada região. Para cada fragmento analisado, determinou-se o volume correspondente à região analisada, através da multiplicação da somatória dos pontos incidentes em todos os cortes analisados pela área associada a cada ponto ($0,004 \text{ mm}^2$) e pela distância entre os cortes ($0,6 \text{ mm}$). Assim, aplicando-se o método de Cavalieri, o volume de uma estrutura é dado pela multiplicação da somatória dos pontos pela 'constante' $0,0024 \text{ mm}^3$, resultante da multiplicação da área do ponto ($0,004 \text{ mm}^2$) pela distância entre os cortes ($0,6 \text{ mm}$), conforme as fórmulas a seguir:

$$\text{Volume Coágulo} = (\sum \text{pontos coágulo} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Volume Infiltrado inflamatório} = (\sum \text{pontos infiltrado inflamatório} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Volume Córnea} = (\sum \text{pontos córnea} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Volume Epiderme} = (\sum \text{pontos epiderme} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Volume Derme} = (\sum \text{pontos derme} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Volume Anexos} = (\sum \text{pontos anexos} \times 0,0024 \text{ mm}^3)$$

A soma dos volumes de todas as estruturas analisadas corresponde ao volume de toda a lesão, no caso, de todo o ferimento em cicatrização, conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Volume (V) da lesão} = \text{Vcoágulo} + \text{Vinfiltrado inflamatório} + \text{Vcórnea} + \text{Vepiderme} + \text{Vderme} + \text{Vanexos}$$

Quando necessário, foi calculada, ainda, a fração de volume (V_v) dos elementos estudados ($V_{v\text{coágulo}}$, $V_{v\text{infiltrado inflamatório}}$, $V_{v\text{córnea}}$, $V_{v\text{epiderme}}$, $V_{v\text{derme}}$, $V_{v\text{anexos}}$) dividindo o volume das respectivas estruturas, pelo volume da lesão para cada tempo experimental, apresentada em porcentagem (Howard e Reed, 2005).

3.6.3.2 Análise histológica das fibras colagênicas

Para estudo qualitativo da derme, foram analisadas as lâminas coradas com HE e as lâminas coradas com *Picrosírius* nos diferentes tempos pós-lesão. Já o estudo quantitativo do colágeno, foi feito através da análise das lâminas coradas com *Picrosírius* sob luz polarizada. Para tanto, foram obtidas imagens digitais randomicamente selecionadas de 8 cortes histológicos para cada animal. Foram obtidas fotografias digitais com objetiva de 20 X com os mesmos equipamentos e técnicas utilizados na captação das imagens das lâminas coradas com HE (descritos no início do item 3.6.3.1) e, no mesmo campo histológico, procedia-se à polarização da luz, para que fosse capturada a birrefringência correspondente ao colágeno no mesmo campo da lesão. Cada imagem obtida dos cortes corados com *Picrosírius* foi processada com auxílio do programa *Image Pro-Plus 6.0*, de modo a selecionar apenas as fibras colagênicas, visualizadas por sua intensa refringência. A seleção do colágeno foi feita no mesmo programa, assim como o cálculo da área correspondente, utilizando-se, para isso, as fotomicrografias sob luz polarizada (Figura 6). Após o cálculo da área correspondente ao colágeno, procedia-se a seleção de toda a lesão, nos cortes sob luz convencional. Desse modo obtinha-se, também, o valor da área total da lesão.

Figura 6 - Cortes histológicos da pele após coloração com *Picrosirius*: a) microscopia convencional; b) mesmo campo visualizado sob luz polarizada, destacando as fibras colagênicas; c) seleção da região de interesse (colágeno) para cálculo da área correspondente, programa *Image ProPlus*®.

Para o estudo quantitativo da fração de área ou densidade da área do colágeno, foram analisadas as lâminas coradas com *Picrosirius*. Sabendo-se que a fração da área ocupada por uma estrutura num dado compartimento de referência num corte bidimensional (ex. fração de área ocupada por colágeno fibrilar no processo de reparo) corresponde à área do colágeno sobre a área total da lesão, apresentada em percentual, temos que:

$$A_{\text{fibras colagênicas}} = A_{\text{fibras colagênicas}} / A_{\text{lesão}}$$

Finalizando a análise das lâminas coradas em HE e *Picrosirius*, foram mensurados com auxílio dos programas *Image J*®, *Image ProPlus*® e *Microsoft Excel*, os seguintes parâmetros: 1) Espessura das camadas córnea, epidérmica, dérmica e espessura de anexos; 2) Volume de coágulo, infiltrado inflamatório e das camadas córnea, epidérmica, dérmica e anexos; bem como o volume total da lesão; 3) Fração de área ou densidade de área das fibras de colágeno na derme.

3.6.3.3 Imunoistoquímica com PCNA

A densidade de área marcada positivamente para PCNA foi calculada após avaliação das imagens correspondentes. As medidas foram realizadas com auxílio do software *Image Pro Plus 6.0* a partir de fotomicrografias obtidas dos cortes histológicos. Quatro cortes por animal, randomicamente selecionados, foram avaliados e as fotomicrografias foram obtidas com objetiva de 10 ou 20 X, de maneira que a visualização da marcação imunoistoquímica fosse otimizada. A fração de área marcada positivamente foi calculada como a razão entre a área positiva para PCNA e a área total da lesão no campo em questão; os resultados, expressos em percentagem. As lâminas processadas com o marcador PCNA foram fotografadas com a mesma técnica descrita acima para as lâminas coradas em HE (item 3.6.3.1). As imagens capturadas foram processadas pelo programa *Image ProPlus 6.0* com a mesma técnica descrita anteriormente para cálculo da densidade de área do colágeno (item 3.6.3.2). Ou seja, a região marcada com PCNA, que aparece em marrom ou castanho, foi selecionada e, através do programa, pôde-se calcular sua área correspondente. Após esse procedimento, com a seleção de toda a lesão é possível obter-se o valor da área total da lesão. A partir desses valores, é calculada a fração ou densidade de área marcada pelo PCNA.

3.6.3.4 Microscopia de Fluorescência

As lâminas produzidas por cortes de congelação foram submetidas ao Microscópio de Fluorescência (MF). No MF, buscou-se a visualização da fluorescência decorrente da distribuição da PpIX com emissão de luz na faixa de 600-715nm. A luminosidade natural da sala foi reduzida por meio de estruturas opacas aderidas às janelas e a luminosidade artificial controlada por dispositivos elétricos comuns, os interruptores, que permaneceram desligados durante o exame e fotografia das lâminas. Foram utilizados 02 tipos de filtros

no microscópio de fluorescência; filtro I, que excita no comprimento de onda na faixa de 450-500nm e permite a emissão de fluorescência acima de 520nm e o filtro II, que excita na faixa de 550nm e permite a emissão de fluorescência acima de 580nm. O microscópio utilizado nesse estudo dispunha de câmera acoplada na lente ocular, permitindo não só a análise das lâminas em tempo real, mas também a captura e armazenamento das imagens. O estudo das lâminas de MF restringiu-se à análise qualitativa. Algumas imagens capturadas no sistema serão mostradas a seguir, no item 4.

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram coletados e calculados conforme descrição anterior. Em seguida, foram codificados e transferidos para um banco de dados no *Microsoft Excel* (versão 2007), onde foram realizados testes estatísticos. Parte das análises estatísticas foi realizada com auxílio do *software SPSS 13.0®* (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows.

A caracterização geral dos resultados foi realizada por análise descritiva das variáveis, por meio de dados absolutos e relativos, medidas de tendência central (média ou mediana) e dispersão (desvio padrão ou erro padrão), conforme indicado nas legendas dos gráficos.

Inicialmente, efetuou-se o teste de *Shapiro-Wilk* para avaliar a aderência à distribuição normal (Gauss) das variáveis. Valores elevados na significância ($>0,05$) indicam que a distribuição cumulativa observada (DO) corresponde a uma distribuição teórica normal (DN). Assim, empregou-se testes paramétricos para variáveis com distribuição normal ($DO \approx DN$), e não-paramétricos para os demais. Em relação a todas as análises, considerou-se como significativo o nível de 5% (valores de $p \leq 0,05$).

Para as relações entre variáveis com distribuição normal, usou-se o teste *t* de *Student*, avaliando-se as médias e os desvios padrão de cada grupo, enquanto que para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi empregado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

No que se refere à comparação dos valores de fluorescência e dos dados histológicos ao longo do tempo, foi empregado o teste de *Kruskall-Wallis* com correção de *Bonferroni*.

Por fim, para correlação entre variáveis, foi utilizado o teste de *Pearson* e modelo de regressão linear.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Acompanhamento dos animais

Os animais utilizados nesse estudo não apresentaram sinais de desconforto, alterações de hábitos ou distúrbios de alimentação ou ingestão de água. Mantiveram peso corporal estável durante os experimentos e os sítios cirúrgicos não apresentaram sinais de contaminação ou infecção. Na maioria dos animais, não foi preciso fazer a retirada dos pontos e do fio de sutura. Em média, após 2 (dois) dias do procedimento cirúrgico, foi observada a caída ‘espontânea’ dos pontos. É provável que este fato tenha ocorrido devido à manipulação do fio pelos próprios animais ou pela conformação da pele, demasiadamente fina, exteriorizando o fio por contiguidade.

Durante os experimentos, os animais apresentavam recuperação anestésica rápida e satisfatória sendo colocados de volta às suas gaiolas. A medicação aplicada foi bem tolerada e não induziu nenhum desconforto nos animais. Apenas dois camundongos, na fase inicial, apresentaram leve eritema na área ‘tratada’, mas que regrediu espontaneamente em poucas horas. Para os procedimentos de coleta da fluorescência, bem como para os demais procedimentos descritos nesse trabalho, não foi necessária a contenção dos animais.

4.2 Análises macroscópica e dermatoscópica do ferimento cirúrgico

Os ferimentos na pele dos animais foram acompanhados durante os primeiros 3 meses de PO. Os animais foram sistematicamente fotografados com tarjeta do respectivo DPO e identificação própria, antes do procedimento de coleta da EF. Dessa maneira, foi possível estudar, de forma individualizada, o aspecto da cicatrização e os respectivos valores de fluorescência. Foram

realizadas duas fotografias por animal: a) fotografia comum, macroscópica e b) sob lente de aumento de 20 X (Dermatoscópio *DermLite PRO-HR®*).

Fotografias de todos os animais em todos os tempos de PO foram avaliadas para descrição das principais características apresentadas durante o fechamento da ferida. As fotografias em grande aumento (20 X) serviram para corroborar as características visíveis macroscopicamente ou, em alguns casos, acrescentar achados que não foram possíveis ao exame e fotografia comuns.

As lesões seguiram um padrão visual semelhante nos animais de ambos os grupos, para cada tempo de pós-operatório. De uma forma geral, é possível resumir o fechamento dos ferimentos como: formação de crosta superficial; fechamento do ferimento a partir das bordas da lesão, seguindo para o centro da mesma e, finalmente, com o término do processo de fechamento ou de epiteliação, a formação de uma cicatriz delgada, de tonalidade clara, com leve depressão na sua região mais central. A descrição detalhada e fotografias experimentais seguem adiante.

4.2.1 Avaliação macroscópica no 2º dia de PO

A Figura 7 mostra os principais achados durante esse período de cicatrização. Os ferimentos apresentavam uma coaptação adequada das bordas, sem deiscência ou abertura da incisão, mostravam uma crosta superficial e profunda de relevante extensão e espessura, bem aderida à base. A crosta abrangia toda a lesão, ou seja, a região mais central e a periférica; apresentava superfície áspera e, a coloração variava do amarelo ao vermelho, apresentando, na maioria dos animais, uma tonalidade avermelhada. Com a lente de aumento, foi possível acrescentar os seguintes achados: as bordas dos ferimentos apresentavam-se avermelhadas, por provável derrame de sangue para o interstício. Na região central do ferimento visualizava-se uma marca de pontos relacionada à sutura durante o procedimento cirúrgico.

4.2.2 Avaliação macroscópica no 5º dia de PO

Aos 5 dias de PO, as lesões mostravam-se reduzidas em todos os animais. A crosta mostrou-se discretamente mais superficial e contraída, e, reduzida a partir da periferia e profundidade da lesão. A tonalidade mostrava-se predominantemente alaranjada e com menos constituintes de tons avermelhados. As bordas dos ferimentos apresentavam leve derrame de sangue, sendo este, discretamente reduzido em relação ao período anteriormente descrito (Figura 7).

4.2.3 Avaliação macroscópica no 8º dia de PO

Durante esse período, o ferimento mostrava-se consideravelmente contraído. A crosta assumia padrão de menor profundidade, de superfície mais seca e tonalidade mais amarelada. As bordas dos ferimentos apresentavam-se elevadas, dando a impressão de que o centro do ferimento apresentava uma depressão. Através da lente de aumento de 20 X, foi possível observar que o ferimento apresentava áreas sem crosta, principalmente em suas bordas, mostrando-se com áreas lineares de tonalidade rosada. As bordas dos ferimentos vistos nesse aumento, não mostravam pontos vermelhos, ao contrário dos dias anteriores analisados, onde essa tonalidade mostrava-se distribuída 'em faixa' acompanhando toda a borda do ferimento (Figura 7).

4.2.4 Avaliação macroscópica no 11º dia de PO

A Figura 7 retrata os principais achados nesse período. Os ferimentos mostravam avanço no processo de fechamento, com menor proporção de crosta e maior de pontos e/ou faixas de tonalidade rosada. Quando presente, a crosta restringia-se à região central do ferimento e sua tonalidade era mais regular, com área central avermelhada e área periférica amarelada. A região

periférica da crosta, por mostrar-se seca e superficial, por vezes, desgarrava-se com facilidade. As bordas dos ferimentos persistiam elevadas e com discreto aumento da sua elevação, tomando-se como base os dias de PO anteriormente apresentados. Nenhum achado foi acrescido sob visualização com lente de aumento (Figura 7).

4.2.5 Avaliação macroscópica no 14º dia de PO

Aos 14 dias de PO, apesar do avançado processo de cicatrização, persistiam, ainda, pequenos pontos de crosta superficial ao longo do tecido epitelizado, que era predominante. As bordas do ferimento mostravam-se pronunciadamente elevadas e, à palpação, percebia-se processo contíguo de infiltração adjacente e subjacente. No exame sob lente de aumento, os achados encontrados iniciais foram corroborados (Figura 7).

4.2.6 Avaliação macroscópica no 20º dia de PO

Aos 20 dias PO, os ferimentos apresentavam processo de epitelação da ferida praticamente completado, apenas diminutas áreas demonstram processo de fechamento. A crosta, por vezes ainda presente, mostrava-se puntiforme, no centro ou em área para-central do ferimento, com tonalidade alaranjada esmaecida. As bordas ainda apresentavam elevação, porém, de menor intensidade quando comparadas aos dias anteriores, sobretudo em relação ao dia 14 de PO.

Figura 7 - Fotografias macroscópicas e dermatoscópicas da cicatrização da pele dos animais nos dias 2, 5, 8, 11, 14 e 20 de PO. À esquerda, fotografias comuns e, à direita, fotografias correspondentes sob lente de aumento de 20X.

4.2.7 Avaliação macroscópica no 27° dia de PO

Nessa fase, os animais apresentavam satisfatório processo de cicatrização. As lesões mostravam-se, predominantemente, com áreas de fechamento, descritas anteriormente como faixas lineares de tonalidade rosada. A crosta não ocupava a superfície do ferimento, porém, no lugar dela, visualiza-se uma tonalidade róseo-alaranjada. Ao toque, percebia-se discreta elevação e aspereza da região central da lesão em relação às demais áreas da mesma. A tonalidade central róseo-alaranjada, dada pela saída da crosta, é melhor visualizada e corroborada pela lente de aumento de 20 X (Figura 8).

4.2.8 Avaliação macroscópica no 34° dia de PO

Nessa fase da cicatrização, todos os ferimentos encontravam-se completamente epitelizados e, em lugar da tonalidade róseo-alaranjada deixada pela saída da crosta, vista aos 27 dias de PO, havia uma tonalidade uniformemente rosada, distribuída ao longo da lesão. Esta visualização foi possível, na maioria dos animais, somente com o uso da lente de aumento, uma vez que, a olho desarmado, era visível apenas uma cicatriz cirúrgica de tonalidade esbranquiçada (Figura 8).

4.2.9 Avaliação macroscópica no 41°, 48°, 55° e 76° dia de PO

Nos dias 41, 48, 55 e 76 de PO, as lesões mostraram-se semelhantes. Macroscopicamente, era visualizada uma discreta cicatriz linear, com leve depressão central, mostrando tonalidade ora brancacenta, ora tendendo à coloração da pele normal do animal. Sob lente de aumento (20 X), não era possível perceber a tonalidade rosada anterior (34 dias de PO); em lugar desta, percebia-se tonalidade azul-violáceo (Figura 8).

Figura 8 - Fotografias macroscópicas da cicatrização da pele dos animais nos dias 27, 34, 41, 48, 55 e 76 dias de PO. À direita das fotografias dos dias 27 e 34 de PO, fotografias sob lente de aumento de 20 X (Dermatoscópio *Dermlite PRO HR®*).

4.3 Análise histológica qualitativa

Os cortes corados com HE serviram para avaliação qualitativa e quantitativa dos achados histológicos gerais durante o processo de cicatrização. As lâminas coradas com *Picrosírius* foram usadas para avaliação da morfologia, distribuição e quantificação das fibras colagênicas na derme. Sob essa coloração, a refringência seletiva do colágeno permite sua quantificação com segurança, conforme descrito no item 3.6.3.2 e mostrado na Figura 6.

O padrão de reação tecidual foi semelhante nos animais de ambos os grupos avaliados, para cada tempo de PO. Observou-se que houve reparo do ferimento com seu fechamento completo, após promoção de todas as etapas do processo cicatricial: coagulação, inflamação, proliferação e remodelação. Por esse motivo, a descrição qualitativa histológica será feita em conjunto. Porém, para comparação entre os grupos, os dados quantitativos serão mostrados separados.

Foi possível observar que, por vezes, a lesão apresentava características histológicas marcantes na região central e, na periferia, apesar da semelhança apresentada, os achados eram mais sutis, conforme mostrado adiante. Nesse contexto, todo o material da lesão foi emblocado e submetido aos cortes histológicos, incluindo as margens de pele sadia, permitindo, quando necessário, a comparação entre o tecido em regeneração e as características da pele normal do animal.

4.3.1 Avaliação histológica no 2º dia de PO

A figura 9, a seguir, ilustra o aspecto histológico do 2º DPO. A área de reparo se caracterizava pela formação de um tampão hemostático (coágulo) no centro da lesão, indo da superfície até a profundidade da mesma, ou seja, nas camadas mais profundas da pele. Nesse período, visualizava-se, ainda, uma

grande quantidade de células inflamatórias, especialmente no nível inferior da lesão. A epiderme em reparação mostrava discreto aumento em espessura em relação à epiderme normal do animal.

Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico no 2º DPO, mostrando grande coágulo na região central (seta vermelha) com rico infiltrado inflamatório subjacente (seta roxa) e epitélio discretamente espessado (seta azul) nas bordas (HE, 8 X).

As lâminas coradas em *Picrosírius* foram examinadas ao microscópio para caracterização das fibras colagênicas. Sob luz convencional, as fibras de colágeno não foram visualizadas na lesão. À luz polarizada, havia ausência de fibras na zona central da lesão; mas, de maneira oposta, nas bordas, foram observadas espessas fibras de colágeno e, no assoalho, surgia uma delicada trama de reparação, com refringência esverdeada.

4.3.2 Avaliação histológica no 5° dia de PO

No 5° DPO, a lesão mostrou-se reduzida em todos os animais, principalmente o coágulo e processo inflamatório que se mostraram menos exuberantes. Em alguns campos, em permeio ao infiltrado inflamatório, foram observados alguns fibroblastos, formando um tecido conjuntivo imaturo, intensamente celularizado. As estruturas epiteliais adjacentes, como a epiderme (incluindo a camada córnea) e os anexos cutâneos, mostraram-se mais evidentes do que no 2° DPO. Foi possível visualizar, ainda, o espessamento da parede de alguns anexos cutâneos (Figura 10).

Figura 10 - Corte histológico no 5° DPO. Lesão apresentando redução do coágulo e infiltrado inflamatório. O tecido epitelial das bordas do ferimento, representado pela epiderme (seta azul) e parede dos anexos (seta verde), mostra-se exuberante em relação à pele normal adjacente (HE, 6 X).

Em relação à distribuição das fibras colagênicas, a análise das lâminas coradas com *Picrosírius* mostrou que a morfologia do colágeno perilesional praticamente não havia se modificado em relação ao segundo dia de PO, porém, havia um leve aumento do número de fibras localizadas na faixa intermediária e profunda do ferimento, mostradas, ainda, como uma fina trama de fibrilas de colágeno, sendo estas de refringência verde e alaranjada (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografia de lâmina corada com *Picrosírius* (20 X) no 5° DPO. À esquerda, sob luz convencional e à direita, sob luz polarizada. Em relação ao 2° DPO, nota-se discreto aumento de rede fibrilar no centro da lesão, com refringência fraca nos tons esverdeados e alaranjados.

4.3.3 Avaliação histológica no 8° dia de PO

Nessa fase, houve uma aproximação das bordas do ferimento, havendo, portanto, uma redução na área da lesão. Foi possível verificar que em algumas regiões, havia um fechamento quase completo da lesão, mostrado pelo avanço da epitelização na sua superfície. Chamou atenção, nessa fase, um espessamento da camada córnea, sobretudo em relação aos demais dias analisados e, ainda, um material queratinofílico acumulado no interior dos

anexos epidérmicos, fato este não visualizado nos tempos anteriores. Quanto à estrutura da derme, esta apresentava-se mais desenvolvida, com fibrilas mais robustas e com menor infiltrado fibroblástico (Figura 12).

Figura 12 - Corte histológico (HE, 10 X) de pele em cicatrização no 8º DPO. Epiderme (seta azul) e camada córnea (seta amarela) espessadas. Na derme, rico infiltrado fibroblástico (seta preta) associado a anexos epidérmicos volumosos com conteúdo eosinofílico no interior (seta verde).

Nesse período de PO, o colágeno passava a ocupar porções mais superiores da lesão. Contudo, as fibras colagênicas eram ainda delicadas, ocasionalmente pontuais, persistindo, ainda, em algumas regiões, grandes áreas de refringência negativa à luz polarizada (Figura 13). As fibras de colágeno das bordas da lesão passaram a assumir um padrão compacto e horizontal em relação à superfície da pele, apresentando refração predominantemente esverdeada e alaranjada, com discretas áreas de tonalidade avermelhada.

Figura 13 - Lâminas coradas com *Picrosirius* no 8° DPO, sob luz convencional e polarizada. Há aumento de colágeno em todos os níveis da lesão em relação aos dias anteriores, porém, formando fina trama de fibrilas, ainda, pouco detectáveis com luz polarizada (20 X).

4.3.4 Avaliação histológica no 11° dia de PO

As características microscópicas assemelharam-se às do período analisado anteriormente, principalmente quanto à composição da derme: fibras de colágeno mais espessas, ocupando parte central da lesão. Subjacente, é visível rico infiltrado celular composto predominantemente por fibroblastos. No que diz respeito às estruturas epiteliais, como camada córnea, epiderme e anexos epidérmicos, foi possível observar um aumento marcante desses compartimentos, sobretudo em relação aos dias anteriores analisados e à pele normal do animal (Figura 14). Os anexos epiteliais mostraram, ainda, conteúdo eosinofílico no interior.

Figura 14 - Fotografia de corte histológico no 11º DPO. Camadas córnea (seta amarela) e epidérmica (seta azul) estão espessas, sobrejacente a anexos volumosos (seta verde), com conteúdo eosinofílico no interior (10 X). O colágeno mostra-se mais fibrilar do que celular, nas porções média e profunda da lesão.

A partir desse dia, na análise das lâminas coradas em *Picrosírius*, a rede de colágeno ocupava as porções mais superiores da lesão, adjacente à epiderme. Porém, sob luz polarizada, percebe-se, que a rede de colágeno era formado por fibras delicadas e pouco refringentes, em tons predominantemente alaranjados (Figura 15).

Figura 15 - Imagens das fibras de colágeno no 11º DPO. O colágeno, que já ocupava praticamente toda a lesão, assume agora, um padrão de fibras mais agregadas, por vezes indo de uma borda à outra da lesão. Nota-se a presença de fibrilas de tom alaranjado na região central da lesão (20 X).

4.3.5 Avaliação histológica no 14º dia de PO

Nesse período é possível visualizar, à microscopia convencional (HE), uma epiderme ricamente espessada, com uma camada córnea sobreposta igualmente exuberante. À profundidade, a derme passa a ter uma trama cada vez menos celular do que os dias que antecedem esse período, porém, apresentando aumento de anexos epiteliais. Esse aumento, ora representado por aumento no número; ora, por aumento das suas dimensões; estando, muitas vezes, com material eosinofílico armazenado em seu interior, sugerindo o acúmulo de queratina (Figura 16).

Figura 16 - Corte histológico (HE, 10 X) de lesão no 14º DPO. É notável o espessamento da epiderme (seta azul) e camada córnea (seta amarela).

A análise das lâminas de *Picrosírius* sob luz convencional, mostrou uma distribuição mais homogênea do colágeno, ocupando toda a área em regeneração. Sua tonalidade se aproximava mais daquela da pele sã adjacente. Sob a luz polarizada, contudo, esse mostrou-se, ainda, como uma estrutura imatura e, portanto, fraca refringência de fibrilas de tonalidades verde e laranja (Figura 17).

Figura 17 - Corte histológico no 14º DPO (Picrosirius). No centro da lesão, há uma coloração vermelho claro (à esquerda); sob luz polarizada (à direita), as fibras de colágeno ainda são imaturas e delgadas, mostrando refringência menor do que a pele normal do animal.

4.3.6 Avaliação histológica no 20º dia de PO

Nessa fase da cicatrização, observa-se persistência do espessamento epitelial (camadas córnea e epidérmica), porém, de menor intensidade do que nos dias anteriores. A quantidade de anexos estava sensivelmente reduzida e, os poucos anexos ainda presentes, estão imersos em um denso tecido conjuntivo, com colágeno mais denso e compacto. Chamava atenção a partir desse dia de PO, uma redução importante na espessura da derme (Figura 18).

Figura 18 - Corte histológico de pele em reparação no 20° DPO (HE, 10 X). O epitélio mostra espessamento mais discreto, nas camadas córnea (seta amarela) e epidérmica (seta azul) e a derme (seta rosa) mostra-se compacta, com poucos anexos de permeio.

As lâminas coradas com *Picrosírius* apresentaram, na região central, fibras de colágeno coradas de tom rosado mais forte, se aproximando do vermelho. À luz polarizada, as fibras refringentes já ocupavam toda a lesão, se assemelhando estruturalmente à pele normal do animal (Figura 19).

Figura 19 - Corte histológico no 20° DPO (*Picrosirius*, 20x). As fibras de colágeno estão mais compactadas em relação aos dias anteriores avaliados, com birrefringência predominantemente avermelhada.

4.3.7 Avaliação histológica no 27° dia de PO

A análise histológica convencional (HE) nesse tempo de PO mostrou poucas diferenças do dia anteriormente avaliado, são elas: espessamento mais discreto do tecido epitelial; tecido colágeno mais compacto; escassez de anexos mais evidentes no centro da lesão; acentuação da atrofia da derme. Além disso, foi possível visualizar, em alguns cortes, uma disposição crateriforme do tecido, mostrada por uma invaginação da epiderme sobre a derme, formada, provavelmente, pela retração cicatricial ocasionada pela deposição abundante de colágeno (Figura 20).

Figura 20 - Corte histológico (HE, 8 X) de lesão no 27° DPO. Destaca-se, nessa fase, o fechamento do ferimento com camada córnea discretamente aumentada (seta amarela), derme com poucos anexos e rico depósito de colágeno compacto e retrátil (seta rosa), com uma 'invaginação' da epiderme sobrejacente (seta preta).

As lâminas dessa fase, coradas com *Picrosírius*, mostram colágeno com fibras mais organizadas, coradas em vermelho. As fibras de colágeno ocupam todas as porções da lesão, com áreas mostrando compactação dos feixes, dando à imagem, um aspecto de tecido mais homogeneizado (Figura 21).

Figura 21 - Corte histológico de *Picrosirius* (20x) sob luz convencional e luz polarizada, no 27° DPO. O colágeno mostra-se mais abundante e, por vezes, mais evidente do que na pele normal perilesional, sobretudo devido à sua compactação. Em lugar da birrefringência esverdeada, predominam, agora, tons amarelados e avermelhados.

4.3.8 Avaliação histológica no 34° dia de PO

Nessa fase da cicatrização da pele dos animais, observou-se uma tendência à normalização na espessura e volume das estruturas do epitélio (camadas córnea e epidérmica), entretanto, o conteúdo de anexos reduzia-se gradativamente, tornando-se, ausentes ou escassos na lesão. Alguns cortes avaliados apresentaram uma disposição crateriforme semelhante à descrita para o tempo anterior (27°), porém, de menor profundidade. A derme assume um padrão hialino, atrófico e homogêneo, isenta de infiltrado celular (Figura 22).

Figura 22 - Corte histológico (HE, 10 X) de lesão no 34° DPO. O epitélio está semelhante à área perilesional (seta preta), contudo, a derme mostra-se atrófica, com colágeno denso e compactado (seta rosa), com raros anexos de permeio.

A análise das lâminas coradas por *Picrosírius* mostraram, tanto na luz convencional quanto na luz polarizada, um colágeno mais denso, em todas as suas porções. Além disso, a compactação das suas fibrilas mostrou-se mais evidente (Figura 23).

Figura 23 - Análise do colágeno sob luz convencional e polarizada (*Picrosirius*, 20 X) no 34° DPO. Observa-se que o colágeno está formado por fibras mais robustas e compactas.

4.3.9 Avaliação histológica aos 41°, 48°, 55° e 76° dias de PO

Devido à semelhança que apresentaram, as análises desses grupos serão descritas em conjunto. Nesses tempos avaliados, a pele dos animais apresentou espessuras epiteliais, como córnea e epiderme semelhantes à da pele normal, ou seja, espessura e morfologia. A derme, em contrapartida, mostrou-se de espessura diminuída em relação à pele adjacente sem lesão e com menor quantidade de anexos de permeio.

As lâminas coradas com *Picrosirius*, analisadas sob luz convencional e polarizadas, mostraram, em todos os grupos, um colágeno mais maduro, homogeneamente distribuído ao longo da lesão, com grande semelhança estrutural em relação àquele correspondente à pele íntegra do animal, porém, com fibras mais espessas e compactas. No entanto, a análise quantitativa (a seguir), mostrou um aumento gradativo do colágeno ao longo desses dias.

4.4 Análise qualitativa da imunomarcação com PCNA

As lâminas silanizadas e marcadas com PCNA, foram fotografadas com o mesmo material e método apresentado para fotografar as lâminas de HE. Na imunoistoquímica, o tecido não marcado apresenta-se com coloração de tonalidade azulada; enquanto que as regiões marcadas positivamente e, portanto passíveis de análise, mostram-se com tonalidade marrom. No presente estudo, a marcação com PCNA foi predominantemente nuclear, acompanhando, portanto, a distribuição celular. Os detalhes apresentados ao longo da cicatrização serão mostrados a seguir.

Nos primeiros dias de PO (2 e 5 dias), a marcação com PCNA mostrou-se mais evidente nas bordas do ferimento, já que o centro da lesão era formado predominantemente por material amorfo, com predomínio de coágulo e infiltrado celular inflamatório. Sabe-se que as células inflamatórias que migram da corrente sanguínea são células com meia-vida curta e que sua reposição se dá através da proliferação de células toti-potenciais presentes apenas na medula óssea dos animais. Portanto, apesar do rico infiltrado celular inflamatório presente no centro e base da lesão nesses primeiros dias de pós-operatório, foi visualizada fraca marcação com PCNA nessas células, provavelmente, por estas não serem células dotadas da capacidade de proliferação em tecidos periféricos (Figura 24).

Nesses primeiros dias de PO (2 e 5), as bordas do ferimento mostravam-se com marcação mais proeminente na camada basal da epiderme, apresentando coloração marrom escura; a camada mais superior da epiderme, a supra-basal, mostrava-se com tonalidade marrom claro. Igualmente mostravam-se os anexos epiteliais: marcação mais intensa - marrom escuro - na camada basal e marcação menos intensa – marrom claro – nas demais camadas dos anexos (Figura 24).

Nos dias 8 e 11 de PO, a lesão mostrava-se completamente epitelizada e, por isso, em substituição ao coágulo central, existia uma epiderme ricamente

espessada. Em semelhança aos dias anteriores, neste dia de PO, a marcação da camada basal da epiderme mostrava tonalidade marrom escuro. Já as camadas superiores, apresentavam marcação marrom mais intensa do que nos dias anteriores (Figura 24).

No 14° DPO, diferentemente dos dias que o antecederam, a derme apresentava tonalidade marrom intenso, de forma dispersa e homogênea. Pontos com marcação mais intensa foram coincidentes com núcleos de células fusiformes, visíveis apenas no microscópio sob grande aumento. Esses núcleos fusiformes são característicos dos fibroblastos que, nessa fase, provavelmente, encontravam-se em intensa atividade de proliferação na derme superficial, média e profunda (Figura 24).

A partir do 20° DPO, com adelgaçamento da epiderme e redução do infiltrado fibroblástico na derme (descritos no item 4.3), houve menor marcação imunoistoquímica por PCNA (coloração marrom), havendo, portanto, predominância do fundo azulado. Esse processo de ‘substituição’ do tecido marcado (marrom) pela contramarcação (azul), avançou progressivamente ao longo da cicatrização (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Imunoistoquímica com PCNA (antígeno de proliferação celular nuclear) no: 2°, 5°, 8°, 11°, 14° e 20° DPO. A marcação é mais evidente em epiderme, especialmente na camada basal e em células fusiformes da derme (fibroblastos).

Figura 25 - Fotomicrografias das lâminas imunomarcadas com PCNA (antígeno de proliferação celular nuclear), nos dias 27, 34, 41, 48, 55 e 71 de PO. Nesse período, há predomínio gradativo do tom azulado.

4.5 Análise quantitativa

Fragmentos de tecido cutâneo em regeneração nos dias 2, 5, 8, 11, 14, 20, 27, 34, 41, 48, 55 e 76 pós-lesão foram estudados em duas (2D) e três (3D) dimensões (estereologicamente). Foram estimadas as espessuras das camadas córnea, epidérmica e dérmica e a largura dos anexos (2D); bem como o volume (3D) da lesão, volume das estruturas teciduais (coágulo, infiltrado inflamatório, epiderme, derme e anexos) e fração de volume das estruturas correspondentes, com a finalidade de comparar valores ao longo do tempo .

Para a análise em três dimensões (3D) foi usada a técnica de estereologia. Uma vez terminada a tomada de dados quantitativos, através da contagem dos pontos do *grid* que incidiram sobre a lesão e suas estruturas (segundo Cavalieri), foram aplicadas ferramentas estatísticas para avaliação comparativa dos dados obtidos.

A análise quantitativa do colágeno e da marcação imunoistoquímica foi realizada em percentual de marcação da área correspondente em relação à totalidade da lesão, conforme descrito nos itens anteriores. Os dados serão apresentados em gráficos para melhor explanação dos valores ao longo do tempo. Os resultados serão mostrados em itens para facilitar a apresentação.

4.5.1 Análise bidimensional (2D)

Os anexos epidérmicos encontrados nos cortes histológicos foram avaliados em conjunto, não havendo, portanto, distinção entre os subtipos de anexos, pois não faz parte do objetivo desse trabalho. Para mensuração da dimensão anexial, foi selecionado o maior anexo para cada corte avaliado, tomando-se como medida a maior dimensão do mesmo. Nos camundongos *hairless*, além das glândulas sebáceas, existem outros anexos epiteliais, formados por estruturas arredondadas e abundantes, que lembram cistos epidérmicos. É provável que estes anexos sejam decorrentes de folículos

pilosos remanescentes e inativos. Para mensuração da espessura da epiderme e da camada córnea, tomou-se, como medida, a região de maior espessura apresentada para cada corte avaliado. Quanto à derme, foi tomada a medida da porção mais central da lesão.

Os animais apresentaram variação em tamanho e quantidade dos anexos ao longo do tempo. Essa variação acompanhou a tendência de espessamento da epiderme, de acordo com o gráfico a seguir (Figura 26-a). Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da largura dos anexos epidérmicos e na espessura das camadas córnea e epidérmica a partir do 5^o dia pós lesão. Esse aumento persiste até 14^o dia de PO e, posteriormente, a largura dos anexos sofre redução gradativa até o final dos dias experimentais, permanecendo sem diferença significativa nos dias avançados de cicatrização.

A variação das espessuras das camadas da pele ao longo dos dias estudados está resumida nos gráficos a seguir (Figura 26-a e b). O eixo vertical sinaliza a variação quantitativa na espessura das camadas da pele, nota-se, ainda, que esses processos ocorrem, na maior parte do tempo, de maneira simultânea, ao observar-se os compartimentos córnea e epiderme (Figura 26-a). Ao contrário disso está o comportamento da espessura dérmica que sofre uma redução gradativa até o último dia analisado (Figura 26-b).

A epiderme sofre aumento importante e significativo ($p < 0,05$) desde os primeiros dias de PO e, a partir do dia 11, esses valores caem e atingem níveis infrabasais a partir do dia 27. Nota-se pelo gráfico (Figura 26-a) que o espessamento da camada córnea é mais discreto do que a epiderme, porém, também apresenta aumento entre os dias 8 e 20 de PO (significativo no dia 11 de PO). A partir do dia 34 de PO, a pele em regeneração mostra-se menos espessa, em todas as suas camadas: córnea, epidérmica e dérmica, conforme descrição qualitativa, no item 4.4.

Figura 26 – Representação gráfica da variação das medidas bidimensionais (2D) das estruturas ao longo da cicatrização. Grupos experimentais: (+) animais com uso de MAL tópico e (-) animais sem o uso da droga. Valores expressos como média. a) Em verde, valores para medidas dos anexos epidérmicos; em azul, da epiderme e em amarelo, da camada córnea. A partir dos primeiros dias de PO, há aumento das estruturas epiteliais e, a partir do 20ºDPO, decai até atingir valores estáveis (sem diferença significativa $p > 0,05$) a partir do 27º dia de PO. Nota-se que a variação tendeu a ocorrer simultaneamente entre esses compartimentos ao longo do estudo e de forma semelhante entre os grupos avaliados, que não mostraram diferenças significativas ao longo do tempo. b) Variação da espessura da derme ao longo do tempo, apresentando queda gradativa.

4.5.2 Análise tridimensional (3D)

Na leitura das lâminas, após a tomada de valores bidimensionais, iniciava-se a contagem dos pontos. Nessa etapa, em todos os tempos de PO, foram avaliados os principais constituintes do processo de cicatrização. Os resultados são concordantes com os dados da literatura (Mokrý *et al.*, 2006) quanto às fases de cicatrização: a) coagulação; b) inflamação; c) proliferação e d) remodelação. A quantificação de cada compartimento é apresentada no gráfico a seguir, o qual mostra a variação ao longo do tempo (Figura 27).

O coágulo é característico do período precoce da cicatrização, fase conhecida como hemostática ou de coagulação, e estava presente em praticamente todas as lâminas avaliadas durante o período compreendido entre os dias 2 e 5 de PO. Esse dado é melhor visualizado através do gráfico a seguir, onde verifica-se, ainda, redução significativa ($p < 0,05$) dos seus valores entre os dias apresentados (2 e 5). No 8^o DPO, desapareceu por completo e permanece dessa maneira até os últimos dias de estudo.

A fase de inflamação ou de afluxo de células inflamatórias, também é uma das etapas precoces da cicatrização, portanto, está presente desde o primeiro dia analisado (dia zero, ou dia 2 de PO). Porém, diferentemente da fase de coagulação, essa fase se prolonga até o dia 14 de PO, apresentando valores significativamente ($p < 0,05$) menores ao longo desse tempo. A partir do dia 20 até o último dia de análise, estava ausente no presente protocolo.

Os demais constituintes analisados em 3 (três) dimensões, ou seja, os anexos e as camadas epiteliais (córnea e epiderme) apresentaram alterações semelhantes em relação à análise bidimensional (Figuras 27 e 26-a, respectivamente), no que diz respeito às fases de aumento e queda nos valores. Porém, nota-se através do gráfico a seguir (Figura 27) que o aumento do volume da camada córnea é mais evidente do que da epiderme, ao contrário da variação bidimensional, que foi o inverso.

Figura 27 - Representação gráfica da variação das medidas tridimensionais (3D - volume) das estruturas ao longo da cicatrização. Grupos experimentais: (+) - animais com uso de MAL tópico e (-) - animais sem o uso da droga. Valores expressos como média. Em verde, valores para medidas dos anexos epidérmicos; em azul, da epiderme; em amarelo, da camada córnea; em vermelho do coágulo e em roxo, no infiltrado inflamatório. Coágulo e infiltrado inflamatório apresentam queda importante e significativa ($p < 0,05$) desde o dia zero (2ºDPO) até o dia 5 e 14, respectivamente.

* $p < 0,05$ dos valores de volume de anexos em relação aos demais dias; ** $p < 0,05$ para valores de volume das camadas córnea e epidérmica em relação aos demais dias.

4.5.3 Análise da imunomarcação com PCNA

A análise quantitativa da marcação com PCNA ao longo do tempo foi de acordo com o esperado, partindo-se dos achados qualitativos apresentados anteriormente (item 4.4). A partir do dia zero, os valores sofrem elevação até atingirem um máximo, aos 14 e 27 DPO (grupos com e sem droga, respectivamente). Após esse período, seus valores passam a sofrer redução gradativa, até o dia 34 de PO, quando não sofre mais mudanças significativas (Figura 28).

Figura 28 - Variação quantitativa da marcação com PCNA – imunoistoquímica para proliferação celular – durante o tempo estudado, ao longo do processo de cicatrização da pele. Grupos experimentais: (+) animais com uso de MAL prévio e (-) animais controle. Os grupos apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) em alguns dias ao longo da cicatrização. Porém, mostraram comportamento semelhante de aumento-queda nos seus valores ao longo do tempo.

4.5.4 Análise quantitativa do colágeno

As lâminas coradas em *Picrosírius* analisadas sob a luz polarizada serviram para quantificação do colágeno. Através do gráfico a seguir (Figura 29), é possível verificar que a produção do colágeno aumenta gradativamente ao longo de todo o experimento, apresentando-se com uma curva ascendente ou crescente. Os valores percentuais de colágeno mostraram aumento significativo ao longo dos dias estudados.

Figura 29 - Variação quantitativa do colágeno ao longo do tempo estudado, pelo teste de correlação de *Pearson*. Os valores para o eixo “Y” são estimados pela fórmula mostrada no canto inferior direito, para ambos os grupos assinalados: (+) grupo com MAL e (-) grupo sem o uso da droga. O gráfico mostra a correlação positiva para o colágeno ao longo do tempo, para ambos os grupos, com valores de “r” indicados, sendo ambas as correlações positivas e significativas ($p=0,0002$ e $p=0,00003$ respectivamente).

4.6 Análises de Fluorescência

Nesse bloco, serão apresentados os resultados da EF e da Microscopia de Fluorescência (MF). Para melhor entendimento, serão apresentados em subitens.

4.6.1 Espectroscopia de Fluorescência

Durante os experimentos, após remoção do creme, e durante a EF, foi visível uma fluorescência de tonalidade vermelho-alaranjada na região correspondente à aplicação da droga: lesão e pele são adjacente. Vale salientar que essa fluorescência macroscópica estava presente apenas no grupo experimental e sob condições experimentais, ou seja, em sala escura, com iluminação apenas do sítio a se estudar (luz azul - LED - 405nm). Salienta-se, ainda, que foi possível observar regiões de fluorescência mais intensa, que variaram de acordo com o tempo de PO. Essas diferenças observadas na intensidade de fluorescência da lesão *versus* pele normal foram corroboradas pelos valores apresentados no microcomputador, através do equipamento de coleta.

Foram comparados os valores coletados de intensidade de fluorescência (IF) do grupo experimental e controle ao longo do tempo, bem como da pele lesionada e da pele sã para ambos os grupos. Em relação ao grupo controle, à risca, não poderíamos chamar os espectros obtidos como espectros de fluorescência, e sim, apenas de espectros de reflexão ou de autofluorescência, já que não utilizamos molécula indutora dessa propriedade. Porém, didaticamente, será chamada de IF ao longo dos resultados e discussão, com a finalidade de facilitar a apresentação dos resultados.

A espectroscopia fornece uma curva que relaciona o eixo das ordenadas com o valor correspondente em comprimento de onda observado. O espectro de emissão de fluorescência pela PpIX foi observado ao longo do experimento.

No grupo controle, onde não houve aplicação prévia de MAL, também foi observada emissão de fluorescência nas faixas de 633 e 703 nm, porém, esta de intensidade significativamente menor em relação ao grupo experimental (Figura 30).

Na análise dos espectros, buscou-se diferenças entre os valores da IF do ferimento ao longo dos tempos experimentais, após aplicação de MAL. Avaliou-se, ainda, a diferença observada entre a pele normal e as lesões na pele dos animais após aplicação da droga, valores (-/+) e (+/+), respectivamente, mostrados nos gráficos a seguir (Figuras 30 e 31). No grupo controle, os espectros foram avaliados sem a indução da produção do fluoróforo em estudo (PpIX), ou seja, sem a utilização prévia de MAL tópico nos animais. A variabilidade da IF ao longo dos dias e entre os grupos estudados, pode ser vista na figura 31. Pode-se observar que a diferença de fluorescência média entre os grupos avaliados foi bastante significativa ($p < 0,01$), sobretudo quando se compara o grupo experimental (+/+) e (-/+), e o grupo controle (+/-) e (-/-), com e sem a utilização prévia do MAL tópico, respectivamente (Figura 30).

Figura 30 - Comparação entre a intensidade de fluorescência média entre os grupos analisados ao longo do experimento. Grupos experimentais (sítios de coleta): (+/+) Fluorescência média da lesão em cicatrização com uso prévio de MAL; (-/+) Fluorescência média da pele sã adjacente, com uso prévio de MAL; (+/-) Fluorescência média da lesão em cicatrização sem uso prévio de MAL e (-/-) Fluorescência média da pele normal adjacente, sem o uso prévio de MAL. *p valor significativo; ** p valor não significativo. u.a.= unidades arbitrárias; barra de erro +/- EP (erro padrão); MAL = Metil-aminolevulinato.

Quando são avaliados os valores de IF de todos os grupos e sítios estudados ao longo dos dias experimentais, tem-se o gráfico a seguir (Figura 31). Através dele, é possível visualizar que nos primeiros dias do processo de cicatrização da pele, até aproximadamente 30 dias de PO, a IF da ferida (+/+) é maior do que a IF pele sã (-/+) com aplicação de MAL. Após esse período, ocorre o inverso, a IF do sítio em cicatrização com MAL (+/+) passa assumir valores menores do que a IF da pele sã com MAL (-/+).

Figura 31 - Variação da Intensidade de Fluorescência (IF) ao longo da cicatrização. Grupos experimentais (sítios de coleta): (+/+) IF da lesão em cicatrização com uso prévio de MAL; (-/+) IF da pele adjacente com uso de MAL; (+/-) IF da lesão em cicatrização sem uso de MAL e (-/-) IF da pele normal adjacente sem o uso de MAL.

Ainda de acordo com a figura 31, observa-se que durante a fase mais precoce da cicatrização, onde a IF da ferida (+/+) mostra-se significativamente maior ($p > 0,005$) do que a IF da pele normal (-/+), há um aumento significativo da IF da lesão (+/+) partir do 2º DPO ($p < 0,004$, Teste *Kruskal-Wallis*) até o dia 11 de PO (curva ascendente). A partir desse dia, a IF sofre uma queda gradual até o dia 27º DPO (curva decrescente). A partir do 34ºDPO há uma queda mais acentuada nos valores de IF, havendo uma coincidência das curvas dos gráficos, ou seja, dos valores dos grupos (+/+) e (-/+), no dia 34 de PO. A partir desse momento, durante o processo de cicatrização da pele, a fluorescência média da cicatriz (+/+) decai significativamente ($p < 0,002$, Teste de *Kruskal-Wallis*) e passa a ter valores médios inferiores ao da pele adjacente (-/+).

A fluorescência média da PpIX na lesão na pele (+/+) ao ser analisada em separado, apresenta um decaimento linear e significativo ($p < 0,001$, $R^2=0,4024$, Teste de correlação de *Pearson*) durante todo o experimento (Figura 32).

Figura 32 - Decaimento linear da Intensidade de Fluorescência (IF) da cicatrização com uso prévio de MAL (grupo +/+) ao longo do tempo – Teste de correlação de *Pearson*. Os valores para o eixo “Y” são estimados pela fórmula mostrada no canto superior direito. O gráfico mostra correlação negativa para IF (+/+) ao longo do tempo, com valor de “r” indicado ($p < 0,002$).

Foi avaliada a correlação entre a Intensidade de Fluorescência (IF) do sítio em cicatrização com uso de MAL (+/+) com os valores de imunomarcação (PCNA) ao longo do tempo. O teste de *Pearson* mostrou correlação forte e positiva ao longo do tempo, conforme apresentado no gráfico a seguir (Figura 33).

Figura 33 – Representação gráfica da correlação entre os valores de IF do sítio em cicatrização com uso de MAL (+/+) e os valores da imunomarcagem por PCNA ao longo do tempo. Teste de correlação de *Pearson* com valores de “Y” estimados pela fórmula no canto inferior direito, seguido do valor de “r”. O teste estatístico mostrou significância, com valor de $p = 0,00025$.

4.6.2 Microscopia de Fluorescência

Foram realizados cortes histológicos de congelação com 10 micras cada, para serem submetidos à análise no microscópio de fluorescência. Cortes histológicos no pós-operatório foram fotografados por câmera acoplada ao microscópio de fluorescência (microscópio *AXIOVERT 2000*) para análise qualitativa. A análise quantitativa desta técnica não foi possível devido à escassez de materiais utilizados nesse experimento, sobretudo, para não haver sacrifício de mais animais. Graças à análise qualitativa das lâminas estudadas com esse método, foi possível corroborar achados experimentais de IF, sobretudo quando confrontados com trabalhos da literatura.

Nas fases iniciais avaliadas sob microscopia de fluorescência, foram visualizadas duas tonalidades de fluorescência, uma avermelhada e outra amarelada. Ambas tonalidades de fluorescências, eram relacionadas fundamentalmente às estruturas epiteliais, tanto da epiderme, como dos anexos epidérmicos. Ao longo da laceração presente nos primeiros dias analisados, foi possível perceber que a borda do ferimento apresentava uma intensidade de fluorescência mais marcante (Figura 34).

Nas fases mais avançadas da cicatrização, as lâminas mostraram fluorescência mais discreta, abrangendo, sobretudo, as estruturas epiteliais (epiderme e anexos) da pele normal adjacente. A região da lesão apresentava baixo sinal de fluorescência, mostrada por área escura no centro da mesma. Quando confrontado com corte seriado corado em HE, era possível correlacionar o baixo sinal apresentado à deposição de colágeno intensamente compactado e denso, com pouco ou nenhum anexo de permeio (Figura 35).

Figura 34 - Corte histológico correspondente à fase inicial de cicatrização. A seta aponta área de fluorescência mais intensa, correspondendo à borda do ferimento em regeneração.

Figura 35 - Cortes histológicos da fase mais avançada da cicatrização (41° DPO) – (a) Microscopia de Fluorescência (MF): faixa com baixa IF (seta); (b) Área de fibrose (intenso depósito de colágeno) com redução de estruturas anexiais – correspondente à área de menor IF na MF (seta).

Discussão

4 DISCUSSÃO

Com a necessidade crescente de se utilizar modalidades diagnósticas não invasivas aplicadas às ciências biomédicas e à medicina, o presente trabalho tem a proposta de estudar um método promissor na discriminação de estruturas teciduais, de maneira rápida, prática, segura e de baixo custo. Mais especificamente, o presente trabalho se propõe a criar um método para estimar a idade ou tempo de lesão em cicatrização ou lesão cicatricial. Para a interpretação dos resultados, foram realizados estudos morfométricos elaborados que possibilitam analisar a estrutura histológica de forma bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D), ou seja, em espessura e em volume, respectivamente.

Vários trabalhos têm mostrado a efetividade e confiabilidade do emprego da fluorescência em métodos diagnósticos, porém, existem trabalhos com resultados discordantes, como o trabalho de Lee e colaboradores (2010). Esses resultados podem estar relacionados a uma série de variáveis, tais como: calibração dos aparelhos, desenho dos estudos clínicos, na complexidade da estrutura histológica e nos diferentes parâmetros de aplicação das técnicas (Smits *et al.*, 2009). Portanto, é evidente a necessidade de mais pesquisas acerca do tema.

Os trabalhos experimentais com EF são de extrema importância para o avanço de técnicas não-invasivas de estudo do tecido *in vivo*. Há uma busca atual crescente por métodos minimamente invasivos, principalmente aqueles que possam proporcionar uma boa correlação histopatológica, método consagrado na análise tecidual. A importância desses métodos está relacionada à praticidade da técnica, aliada à vantagem de ser menos incômoda e dolorosa para o paciente. Assim, apesar de a histologia ser o método padrão-ouro para análise tecidual, novas técnicas de análise complementar podem ser estudadas

para evitar, em algumas situações, procedimentos invasivos que possam ser minimizados ou adiados.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para a análise de alterações patológicas da pele utilizando-se a espectroscopia, mas, até o momento, o presente trabalho é pioneiro na estimativa de tempo de lesão cicatricial utilizando esse método. Dentre esses trabalhos, a maioria dos resultados é promissora e mostra que essa ferramenta óptica pode auxiliar na prática médica.

A escolha por estudar a cicatrização da pele deve-se ao fato de que estas lesões são muito frequentes na prática clínica e médico-legal. Além disso, as complexas alterações moleculares e estruturais que ocorrem no processo de reparo da pele, como a proliferação epitelial e a formação de colágeno, são representativas de diversas condições orgânicas, o que traz, para o método proposto, uma aplicabilidade mais abrangente.

Para realização desta pesquisa foi escolhido o camundongo como animal de experimentação. Algumas características desse animal são vantajosas no âmbito experimental, tais como: a) relativa facilidade na obtenção; b) facilidade de controle e manutenção em gaiolas; c) boa aceitação de dieta e d) elevada resistência a infecção. Além disso, em virtude das similaridades anatômicas e fisiológicas entre camundongos e humanos, é possível que os resultados obtidos nos estudos experimentais de cicatrização utilizando esse animal, possam ser extrapolados para o homem. O fator que contribui para essa correlação é a similaridade nos resultados apresentados em trabalhos utilizando essa linhagem animal e trabalhos que utilizam humanos.

Para que os conhecimentos apresentados possam se tornar aplicáveis na prática clínica, contudo, é necessário associar resultados obtidos em outras pesquisas. Diversos conhecimentos de estados fisiológicos ou patológicos da pele, sobretudo associando-se aos conhecimentos de fluorescência e EF, só podem ser obtidos através de estudos experimentais com animais *in vivo*. Por esse motivo, estudos experimentais utilizando animais são importantes para

somar conhecimentos morfofisiológicos àqueles utilizando humanos, quando a realização de técnicas invasivas é mais restrita. Vale ressaltar que ainda é pequeno o conhecimento sobre métodos de análise por espectroscopia de fluorescência, mas, em diversos centros médicos, essa técnica vem sendo estudada e aplicada isolada ou associada a outros métodos diagnósticos (como a Ressonância Magnética, p.ex.) para aprimoramento de análise de diversos órgãos e tecidos, como suprarrenal, sistema nervoso central, próstata, trato respiratório e urinário.

Outro ponto a ser destacado no presente estudo é a escolha de se realizar a incisão cirúrgica na porção média do dorso dos camundongos, região menos acometida pela movimentação dos membros e, além disso, de menor acesso pelo próprio animal, no que diz respeito à manipulação pelo aparelho mastigatório. A maioria dos autores não especifica a região onde foi feita a incisão na pele dos animais.

A extrapolação direta para seres humanos dos resultados deste trabalho, contudo, deve ser cautelosa, principalmente pelo fato de que a aplicação de MAL (metil-aminolevulinato) em ferimentos cirúrgicos recentes pode causar leve desconforto ao paciente e a manipulação indevida de feridas cirúrgicas pode aumentar o risco de infecções.

Neste modelo foi possível detectar, ao menos parcialmente, o mesmo processo temporal e as mesmas etapas estabelecidas para a cicatrização de lesão cutânea apontadas em alguns trabalhos, seja em animais, seja em humanos. Além disso, o fato de ter sido realizada a análise qualitativa e quantitativa das alterações histológicas, faz com que os dados do presente estudo possam ser facilmente incorporados na literatura sobre o assunto.

Ao compararmos os dados do presente trabalho nas análises macroscópicas e microscópicas qualitativas, é possível verificar que há concordância entre os achados. Durante a fase inicial, macroscopicamente, percebe-se o predomínio de crosta sobre a lesão. Os cortes histológicos dessa fase mostram a presença de tampão amorfo, abrangendo grande parte da

lesão, assim, com boa correlação com a lesão macroscópica. Dessa forma, observa-se que durante os primeiros dias de PO, quando há um predomínio da crosta sobre a lesão, o tampão visto na microscopia, se mostrava também exuberante e, à medida que a crosta reduzia de tamanho macroscopicamente; o tampão, microscopicamente, acompanhava a mesma redução.

A literatura descreve o tampão amorfo, visto na microscopia, com os seguintes constituintes: coágulo, plasma, elementos de queratina da camada córnea, *debris* celulares e fibrina (Singer e Clark, 1999). Na cicatrização de feridas, a contenção do sangramento na fase precoce é uma das tarefas primordiais. Assim, o coágulo é o principal elemento formador desse material amorfo e sofre diminuição com o tempo (Falanga, 2005), e, além da interrupção da sua produção, este passa a sofrer absorção gradual, até desaparecer completamente.

No presente trabalho, a ausência de coágulo ao longo dos dias mais avançados da cicatrização dá a segurança de que o processo seguia um curso natural, sem o aparecimento de novas lesões sangrantes nos animais. Essas situações eram possíveis caso existisse manipulação da lesão pelo próprio animal ou por demais animais da mesma gaiola, em briga por disputa de liderança, o que é relativamente mais frequente em animais do sexo masculino do que em animais do sexo feminino. Ressalta-se, todavia, que não foram utilizados animais do sexo feminino devido a mudanças hormonais cíclicas, que poderiam interferir no processo de cicatrização das feridas.

Durante a fase mais precoce da cicatrização, aliada à presença da crosta, foi detectável, microscopicamente, proliferação da camada córnea, com aumento da espessura. Dessa forma, é provável que a crosta visualizada macroscopicamente seja formada também pelos elementos presentes na camada córnea, especialmente a partir do 8^o DPO, quando não havia mais coágulo. A camada córnea apresenta um período de proliferação com aumento de espessura e volume que se prolonga além dos dias do processo de hemostasia ou de coagulação. É possível que esse processo de proliferação

prolongado ocorra como mecanismo de defesa e de proteção do tecido novo que se forma subjacente à lesão, pois a camada córnea apresenta moléculas semipermeáveis, conferindo, portanto, defesa da pele contra possíveis agentes externos agressores (Murphy, 2005).

Participam também da formação da crosta, os *debris* celulares, formados por material celular necrótico. Ocorre morte celular no início do processo de cicatrização porque há um aumento das necessidades metabólicas, e, portanto, o suprimento sanguíneo torna-se inadequado para as novas necessidades teciduais (Iida e Grotendorst, 1990). A fibrina é participativa da cascata da coagulação, ajudando na formação do coágulo e, portanto, da crosta macroscópica e do tampão visto nos cortes histológicos. Alguns autores usam o termo ‘fibrina’ como sinônimo de ‘coágulo’, o que é inadequado do ponto de vista acadêmico, uma vez que uma molécula não pode ser identificada macroscopicamente ou à microscopia convencional.

Apesar das evidências de que o tampão histológico presente nos primeiros dias de PO, seja formado por vários constituintes, consideramos, na leitura das lâminas e na análise quantitativa, sua formação exclusivamente por coágulo, já que a discriminação precisa entre os constituintes não foi realizada no presente protocolo.

Ainda durante os primeiros dias analisados neste protocolo (2° e 5° DPO), os ferimentos apresentaram tonalidade avermelhada nas bordas, sobretudo quando avaliados sob lente de aumento de 20 X (dermatoscopia). Essa tonalidade avermelhada pôde ser relacionada ao extravasamento de sangue e, conseqüentemente, de hemácias, após a ruptura vascular ocasionada pela incisão cirúrgica. Apesar disso, esses achados não foram encontrados facilmente na microscopia e, por isso, não foram quantificados.

A partir do 11° DPO, foi visto que o ferimento apresenta uma elevação considerável em suas bordas, persistindo por alguns dias após esse período. Essa elevação pôde ser compreendida e correlacionada aos achados microscópicos. Os cortes histológicos dessa fase mostraram epiderme

significativamente espessada, aliada a infiltrado inflamatório profundo. A proliferação do tecido epitelial a partir das bordas do ferimento é um evento já conhecido e esperado, e citado por diversos autores, como Nishiyama e colaboradores (2011). A sinalização para proliferação é um evento iniciado no núcleo celular, como comando de replicação, com a intenção final de reepitelização e manutenção da barreira protetora da pele. São os queratinócitos mais indiferenciados que possuem essa capacidade, ou seja, aqueles da camada basal da epiderme e das estruturas anexiais (Ramasastry, 2005). Isto explica porque há proliferação dos anexos durante a fase proliferativa e de epitelização da ferida (especialmente entre os dias 8 e 20 de PO), observado nos gráficos das análises bidimensionais e tridimensionais (2-D e 3-D), bem como nos cortes histológicos apresentados (HE e PCNA).

O processo de infiltração de células sanguíneas inflamatórias é algo significativamente marcante durante o processo de reparo. Faz-se presente desde os primeiros dias de PO e persiste, até o 14º DPO. Era composto por células inflamatórias sanguíneas, tais como: eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, com predomínio destes últimos. A diferenciação e quantificação de cada elemento celular do infiltrado não foram realizadas neste protocolo. No decorrer do processo de cicatrização, em meio ao infiltrado inflamatório, passou a haver também um infiltrado celular formado por fibroblastos que, gradativamente produzia elementos do tecido conjuntivo, especialmente o colágeno. A diferenciação entre células sanguíneas e fibroblastos foi realizada com base na literatura, que cita a disposição nuclear como a principal chave para tal diferenciação. As células inflamatórias sanguíneas apresentam, em sua maioria, núcleos arredondados (linfócitos); enquanto que os fibroblastos apresentam núcleos com disposição alongada e fusiforme característica (Junqueira e Carneiro, 1985).

No decorrer do processo de cicatrização, há aumento na produção e deposição de colágeno, que passa a sofrer reorganização, com mudança na disposição, espessura e compactação das suas fibras. A derme e o tecido

tegumentar mostraram, finalmente, depósito abundante de colágeno, com fibras mais espessas e compactas, com poucas células produtoras de tecido conjuntivo, os fibrócitos (Junqueira e Carneiro, 1985).

Durante as fases mais avançadas do período de cicatrização, foi possível, através da lente de aumento, visualizar diferenças sutis na tonalidade da cicatriz. Durante essas fases, ao microscópio de luz não era possível verificar alterações histológicas significativas, o que foi confirmado pela análise quantitativa. Esse achado sugere que algumas alterações sutis somente são de possível detecção através do emprego de técnicas auxiliares, nesse caso, lente de aumento de 20 X.

Comparando, ainda, a macroscopia com a microscopia, nas fases mais avançadas da cicatrização, nos dias 41, 48, 55 e 76 de PO, a pele mostrava redução na espessura. Ao olho desarmado, era possível visualizar redução importante no tamanho da lesão e uma marcante depressão da cicatriz em relação à pele normal do animal. À microscopia, os cortes histológicos mostravam lesões em completo processo de reparação. A pele e, em especial, a derme apresentava espessuras consideravelmente menores do que o dia zero e a pele normal adjacente. A análise quantitativa mostrou uma diferença significativa na espessura da derme.

Os achados descritos acima, correlacionando a macroscopia com a microscopia, puderam ser corroborados pela análise quantitativa das espessuras das camadas da pele dos animais. No primeiro mês de PO, a derme parece ser a camada menos afetada; já as camadas córnea e epidérmica, iniciam a cicatrização (2º DPO) com espessura mais próxima da pele normal, porém, já aumentada e, depois, apresentam aumento significativo de espessura nos dias 5, 8, 11 e 14 de PO. É durante essa fase que ocorre o processo de epitelização do ferimento, com migração dos queratinócitos da borda da lesão, sendo esse, um evento esperado, segundo os autores (Nishiyama *et al.*, 2011).

No segundo e terceiro mês de PO, a espessura epidérmica passa a assumir valores significativamente menores em relação à espessura basal (2º DPO). Sabe-se que a espessura final da cicatriz é variável segundo a espécie e linhagem de animal estudado. Ressalta-se que, no presente trabalho, nenhum animal apresentou distúrbios da cicatrização com hiperproliferação desordenada. Esses estados, relativamente comuns em seres humanos, são conhecidos como cicatrizes hipertróficas e quelóide. Esse achado é confirmado pela análise fotográfica de todos os animais e leitura das respectivas lâminas histológicas. Diante disso, infere-se que o modelo apresentado retrata fielmente a cicatrização fisiológica, sem alterações ou aberrações da cicatrização.

Os anexos apresentaram aumento nas dimensões (2-D e 3-D) na fase precoce da cicatrização e, depois, sofrem um decaimento uniforme. Na análise junto às demais estruturas da pele, é possível verificar que há aumento dos anexos à medida que há aumento das camadas córnea e epidérmica. Isto pode ser explicado pela presença de queratinócitos indiferenciados nos anexos epidérmicos. Esses queratinócitos são ativados por sinalizadores de replicação, sendo que, após esse comando, as camadas epidérmicas e os anexos cutâneos sofrem, simultaneamente, proliferação celular (Nishiyama *et al.*, 2011). Tais dados foram confirmados com a marcação imunoistoquímica com PCNA, onde células presentes da epiderme, especialmente na camada basal, e na parede dos anexos apresentavam marcação mais intensa.

Outra explicação plausível para a proliferação maciça de anexos epidérmicos nas fases iniciais deve-se à necessidade de materiais de proteção da camada córnea contra insultos externos. Em alguns cortes histológicos, foi possível verificar a eliminação transepidérmica de material produzido e retido no interior dos anexos cutâneos. Esse achado reforça a ideia de que o material contido no interior dos anexos contribuía para a formação dos elementos constituintes da camada córnea.

Após os períodos mais críticos da cicatrização, ou seja, após o primeiro mês de PO, verificou-se uma estabilidade da largura dos anexos epidérmicos e,

progressivamente, uma redução no tamanho e quantidade de anexos na pele. Essa redução pode ser atribuída a uma série de fatores: a) término do processo de proliferação; b) exteriorização do material contido no interior dos anexos, com desaparecimento dos mesmos e c) desvio metabólico sinalizador para a proliferação de constituintes da derme, especialmente, o colágeno. Essa produção de colágeno é presente em todos os processos de cicatrização e ocorre, ao menos parcialmente, para promover a formação de uma cicatriz mais resistente à tração (Martin e Parkhurst, 2004).

A análise dos constituintes da cicatrização mostra a formação de um tampão de coágulo central, homogêneo, indo da profundidade até a superfície da pele. Quantitativamente, esse coágulo é significativamente maior nos primeiros dias e seu volume cai consideravelmente entre os dias 2 e 5 de PO. Esse dado corrobora os achados da literatura que tratam sobre o assunto, que refere ser a etapa de hemostasia ou de coagulação o processo mais precoce e fundamental para que os demais se instalem, já que o coágulo forma um meio importante para a migração celular (Clarck *et al.*, 1982). É possível verificar, ainda, que durante o 5º DPO, o processo de hemostasia ocorre juntamente com o processo de proliferação, visto que nesses dias, além da presença do coágulo, há aumento do volume das estruturas epidérmicas, sejam elas a camada córnea, a epiderme ou as estruturas anexiais.

Em resumo, através da análise do processo de cicatrização da pele, pode-se concluir que: a) a maioria dos achados macroscópicos e sob lente de aumento (20 X) são corroborados pelos achados vistos ao microscópio de luz; b) na fase proliferativa, observa-se a promoção do evento em todos os tecidos epiteliais (camadas córnea, epidérmica e anexos cutâneos); c) as etapas ou eventos da cicatrização da pele (coagulação, inflamação, proliferação e remodelação) ocorreram, em parte do tempo, de forma simultânea, de acordo com os achados da literatura (Mokry *et al.*, 2006); d) o evento final da cicatrização dá-se com a formação de uma lesão com depósito abundante de colágeno, ou seja, há cicatrização com formação de um tecido fibrótico, sem a

restauração de algumas estruturas teciduais normais, como os anexos; evento já citado por pesquisadores, como Izadi e Ganchi (2005).

A análise de IF do ferimento com o uso prévio de metil-aminolevulinato (+/+) mostrou variação significativa ao longo do processo de cicatrização; o que não aconteceu com a IF dos demais grupos ((-/+); (+/-) e (-/-)). As alterações que ocorrem no tecido em cicatrização, conforme apresentado, são complexas e, portanto, é provável que os fatores determinantes das alterações da fluorescência da PpIX, sejam diversos e atuem em conjunto, e não isoladamente. Porém, as análises rebuscadas de contagem das estruturas teciduais permitem algumas inferências. A seguir, serão discutidas as principais conclusões que podem ser tomadas, no presente trabalho, quanto aos achados de fluorescência e sua respectiva correlação com as alterações histológicas.

O exato mecanismo de emissão de luz pelas estruturas teciduais ainda precisa ser melhor elucidado. Enquanto há estruturas teciduais visíveis e avaliáveis por microscopia, várias moléculas presentes nos tecidos biológicos também participam da absorção e emissão de fluorescência. Essas estruturas moleculares são variáveis ao longo de diversas situações e, em especial, ao longo da cicatrização, sabe-se que inúmeros fatores de crescimento estão envolvidos (Nahm *et al.*, 2004). Apesar disso, a determinação ou quantificação de moléculas não foi abordada no presente trabalho.

A visualização de fluorescência macroscópica que ocorreu no momento da coleta dos espectros de fluorescência, ou seja, no momento em que havia irradiação da pele dos animais, está de acordo com trabalhos recentes, que estudaram diagnóstico de fluorescência (Smits *et al.*, 2009). Trabalhos como esses mostram que seria possível, com o emprego de luz de comprimentos de onda variáveis, observar, no momento do exame da pele, a fluorescência do fluoróforo correspondente que, no caso da PpIX, é de tonalidade vermelho-alaranjada. Logo, essa observação permite inferir que: a) houve uma satisfatória penetrabilidade e metabolização da droga na pele dos camundongos; b) o processo ocorreu de forma semelhante ao estudado na pele

de seres humanos, conforme apresentado em alguns estudos (Smits *et al.*, 2006).

Outro aspecto que mostra, com maior segurança que o modelo animal é bastante reprodutível em humanos é o fato de que os espectros de fluorescência obtidos após aplicação de MAL tópico foram coerentes com os espectros de emissão da PpIX encontrados na revisão da literatura, apresentando dois picos de emissão, em torno de 633 nm e 703 nm. Esse resultado permite inferir, novamente, que a droga foi satisfatoriamente metabolizada, à semelhança do que ocorre em humanos (Zellweger *et al.*, 2001).

O espectro de emissão da fluorescência da PpIX, foi observado ao longo do experimento, em ambos os grupos avaliados. No grupo sem o uso de MAL, observou-se também emissão de fluorescência nas faixas de 633 e 703 nm, porém, de valores menores significativamente ($p < 0,005$) do que o grupo experimental e, sobretudo, sem diferenças significativas ao longo do tempo. A presença de autofluorescência tecidual ocorre devido à presença fisiológica da PpIX e de outros fluoróforos em tecidos sadios. A emissão de fluorescência por outros fluoróforos pode ser coincidente com a faixa de emissão da PpIX, por exemplo: lipopigmentos, aminoácidos aromáticos, flavinas, colágeno e elastina (Gambichler *et al.*, 2008; Gillies *et al.*, 2000).

Ainda durante os experimentos piloto, ficou estabelecido o tempo de 2 horas para incubação da droga, sob oclusão. Essa escolha foi baseada na literatura, pois muitos trabalhos referem esse tempo como o ideal para o pico de produção da protoporfirina IX após aplicação tópica de MAL (van den Akker *et al.*, 2000; Bugaj *et al.*, 2006). Alguns trabalhos citam um tempo de incubação maior, mas, a maioria deles realizou pesquisas de fluorescência em pele de humanos e, sabe-se, que a pele dos camundongos é consideravelmente menos espessa e, por isso, apresentaria absorção mais rápida da droga. A oclusão da região estudada é procedimento realizado em todos os protocolos estudados sobre o tema, mesmo em humanos. Smits e colaboradores (2009) citam que

períodos maiores de incubação (de até 6 horas) podem ser realizados, mas, com perda significativa quanto à diferenciação entre tecidos sadios e lesionados, visto que há um aumento considerável da IF da pele sadia, aproximando-se, então, dos valores de IF da pele lesionada, reduzindo, a taxa de contraste de fluorescência.

Não foram apresentados os espectros de cada experimento ou de cada sítio de coleta, já que estes se mostram semelhantes, tanto as curvas da pele sã, quanto da lesão, diferindo nas intensidades de fluorescência. Foi apresentada a variabilidade da IF, comparando sítios de coleta, em ambos os grupos estudados. Quanto a essa comparação, foi possível verificar que houve diferença ($P < 0,05$) na IF entre os grupos estudados, ou seja, entre o grupo que recebeu metil-aminolevulinato e o grupo que não passou por esse procedimento. Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as IF da pele sadia em comparação com a pele lesionada, para o grupo experimental, valores de (-/+) e (+/+), respectivamente. Com isso, é possível afirmar que a técnica de EF marcada com o MAL tópico permite diferenciar pele sã da pele lesionada, assim, permite discriminação entre as estruturas avaliadas; enquanto a EF sem a aplicação prévia da droga, não permite essa diferenciação.

Levando-se em consideração apenas os valores de IF do grupo experimental (MAL) ao longo do tempo, observa-se claramente a presença de duas curvas. A primeira delas, crescente, indo do dia 2 até o dia 11 de PO. A partir deste dia, os valores caem linearmente até o dia 34, formando a segunda curva apresentada nos resultados desse gráfico (Figura 31). A partir do dia 34, os valores tendem a ser mantidos até o final das análises, no dia 76.

A IF do ferimento com MAL (+/+) até o dia 27 mostra-se significativamente maior do que a pele normal com MAL (-/+) ($p < 0,0001$). A hipótese mais plausível para essa observação poderia ser a quebra da barreira cutânea durante a cicatrização da pele dos animais. Contudo, isoladamente, não é capaz de justificar a existência de duas curvas diferentes conforme discutido no parágrafo acima, uma crescente (2-11DPO) e a outra decrescente (11-34DPO).

Caso a quebra da barreira cutânea fosse a única justificativa para o aumento apresentado pela fluorescência na fase precoce da cicatrização, seria lógico que o gráfico da IF do ferimento com MAL (+/+) apresentaria uma curva decrescente até a completa epitelização, evidenciando a ligação direta entre essas variáveis. Contudo, foi observado um decaimento na IF da PpIX (+/+) apenas após o dia 11 de PO. Além disso, no dia 11 de PO, o processo de epitelização está completado na maior parte da lesão e na maioria dos animais.

Apesar disso, durante essa fase, observou-se pequenas soluções de contiguidade, compatíveis com fechamentos de feridas cirúrgicas. Segundo trabalhos como o de Smits e colaboradores (2005), a quebra da barreira cutânea influencia significativamente na formação da PpIX, bem como na sua distribuição ao longo do tecido, culminando em valores de fluorescência mais elevados em torno de ferimentos da pele. Em relação à quebra da barreira cutânea, presente na fase precoce da cicatrização, é aceitável que seja uma explicação plausível para o aumento da IF, mas não justifica, isoladamente, todas as alterações apresentadas.

A solução de continuidade na pele nas fases iniciais do processo de cicatrização é fato já relatado em outros trabalhos, mostrando que durante essa fase da cicatrização, ainda não se completou o processo de reepitelização com fechamento da ferida (Santoro e Gaudino, 2005), havendo, teoricamente, maior possibilidade de absorção da droga com consequente maior deposição do fluoróforo correspondente (PpIX). Além disso, somam-se citações da literatura, que correlacionam a maior fluorescência da PpIX com tecidos lesados ou alterados histologicamente (Svanberg *et al.*, 1998; Wennberg *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Sharfaei *et al.*, 2002; Juzenas *et al.*, 2002b).

Nos primeiros dias de PO, entre os dias 2 e 11, a IF do ferimento com MAL (+/+) apresenta aumento linear. Uma vez que, esse período é caracterizado pelas fases de coagulação e de epitelização, esse evento provavelmente acontece devido à hiperproliferação tecidual e pela presença de hemoglobina. Na análise das lâminas dessa fase de cicatrização, é evidente a

presença de coágulo e este sofre regressão entre os dias 2 e 5 de PO. Sabe-se que o coágulo ou tampão hemostático é formado por diversos elementos teciduais, porém, é predominantemente formado por hemoglobina. Esta molécula é um dos elementos teciduais chamados de cromóforos naturais, pois é capaz de absorver luz, com duas faixas de absorção, uma a 428 e outra a 564 nm (Mokrý *et al.*, 2006; Wollina *et al.*, 2009) e, pode atuar minimizando a intensidade de fluorescência.

Durante os primeiros dias de PO, além do coágulo, observa-se também grande volume de infiltrado inflamatório. Esse constituinte, porém, não parece interferir nas análises de fluorescência. Além da sua localização nas camadas mais profundas, não foi encontrada, na revisão da literatura, trabalhos que mostrassem ligação direta entre a distribuição da PpIX e seu respectivo sinal de fluorescência, com as células sanguíneas inflamatórias.

Assim, apesar de os valores de IF tenderem a ser elevados, devido aos possíveis distúrbios dos processos de metabolização da PpIX, ao evento de quebra da barreira relacionado ao processo inicial da cicatrização, há, nessa fase inicial, um fator limitante do aparecimento de valores maiores de IF. Com esse raciocínio, é possível, ainda, entender porque ocorre uma elevação gradativa dos valores de IF na primeira semana de PO. Tal fato pode ocorrer devido ao volume cada vez menor do coágulo, visto que este, uma vez formado inicialmente para conter o sangramento do procedimento cirúrgico, vai sendo paulatinamente absorvido pelo próprio organismo, de maneira a dar 'espaço' para que os demais processos da cicatrização sejam também desempenhados com sucesso.

Ainda durante esse período, compreendido entre as primeiras semanas, a hipótese de participação da proliferação tecidual na intensidade de fluorescência é corroborada pela análise qualitativa e quantitativa dos cortes histológicos. Conforme visto anteriormente, depois de conter o sangramento, o organismo precisa do fechamento da ferida e isto ocorre graças à proliferação intensa da epiderme da borda do ferimento. Nessa fase, foi observado um

aumento significativo do volume epitelial, ou seja: camada epidérmica, camada córnea e anexos epiteliais. Esses resultados, somados às evidências apresentadas pela imunoistoquímica marcada com PCNA, para proliferação celular, e as lâminas de MF, confirmam essa hipótese. A curva de aumento da marcação pela imunoistoquímica é semelhante à curva de aumento das estruturas epiteliais, e representam eventos interligados.

A hipótese de correlação entre a intensidade de fluorescência da pele em cicatrização com uso de MAL (+/+) com a imunomarcação por PCNA é ainda bastante reforçada pelo teste de *Perarson*, mostrando significância estatística ($p < 0,002$). Vale ressaltar que a única diferença apresentada entre os grupos estudados, sob o ponto de vista de análise microscópica, foi na quantificação da imunomarcação por PCNA. Esse evento não foi completamente compreendido e pode ter vários fatores envolvidos. Existem algumas condições que podem ter contribuído para esse fato: a) interação entre a droga presente no tecido do animal (MAL) e os marcadores de imunoistoquímica; b) discreto efeito fotodinâmico causado pela interação dessas moléculas (já citadas) e a exposição à luz azul (LED); c) soma desses fatores à interação com luz visível. A última hipótese parece mais plausível.

Essa hipótese, relacionando a IF ao período de proliferação e epitelização da cicatrização, é apoiada pela observação de diversos estudos que correlacionam a intensidade de fluorescência ao espessamento epidérmico, como nas lesões de psoríase (Smits *et.al.*, 2005) e em lesões pré-malignas e malignas, como carcinoma de células escamosas (Kleinnpening *et.al.*, 2006; Stenquist *et al.*, 2006), ou em outras condições clínicas (Svanberg *et al.*, 1998; Wennberg *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Sharfaei *et al.*, 2002; Juzenas *et al.*, 2002b).

Consistente com isso, já se sabe que os queratinócitos têm sido implicados na cicatrização (Izzo *et al.*, 2001), especialmente na fase de epitelização e, de acordo com os resultados do presente trabalho, são as células responsáveis pelo maior índice de proliferação tecidual, confirmados

pela imunoistoquímica e medidas de volume epitelial ao longo do tempo. Além disso, sabe-se que os queratinócitos não são exclusivos da epiderme e residem, também, na porção profunda dos anexos. Essas células expressam receptores para os fatores de crescimento que são liberados durante a cicatrização, resultando em proliferação anexial e está em acordo com os resultados apresentados na presente pesquisa.

Smits e colaboradores (2009) demonstraram que a presença de DNA, ou seja, de núcleos celulares na epiderme seria o maior responsável pelo acúmulo de grandes quantidades dessa protoporfirina, sendo, portanto, a IF, um marcador relacionado à epiderme. De fato, dentre todas as camadas da pele, a epiderme é aquela formada por maior população celular. Outro fator citado como fundamental para o acúmulo da PpIX, seriam as proteínas teciduais. Para os autores, seriam aquelas proteínas associadas à epiderme que teriam uma participação majoritária na IF.

Discorrendo, ainda, sobre a proliferação epitelial, há indícios que esta seja mais importante e participativa na IF do que a proliferação tecidual como um todo. Essa inferência pode ser tomada porque foi observada intensa proliferação dérmica (fibroblastos) nas lâminas de imunoistoquímica a partir do dia 14 de PO; porém, nessa fase, a IF passou a apresentar valores decrescentes.

Apesar disso, nesse contexto, não se sabe se a celularidade dérmica (fibroblastos e fibrócitos) influencia pouco na metabolização da PpIX; ou se a técnica não permite aferições nessa região. Tal limitação deve-se à dificuldade de penetração da droga, citada por alguns autores como possível apenas até a derme superficial (De Bruijin *et al.*, 2008). Além da baixa penetrabilidade da droga no tecido, soma-se o fato da limitação do alcance da luz no tecido avaliado. A luz azul é referida como capaz de penetrar no máximo 0,5 mm do tecido cutâneo (Gambichler *et al.*, 2008) e, no presente trabalho, a maioria dos animais apresentava uma pele com espessura maior.

Muitos estudos têm demonstrado que o estrato córneo limita a penetração de ALA e MAL (Kleinpenning *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2006), porém, no presente trabalho, no estágio em que houve aumento da fluorescência da PpIX, houve aumento da camada córnea. Sabe-se que ferimentos de pele apresentam defeitos não só estruturais, mas também funcionais. Assim, a camada córnea formada em excesso durante a cicatrização poderia apresentar anormalidades dos seus mecanismos de barreira, provavelmente em decorrência de um tecido imaturo, uma vez que, diferentemente do que ocorre na pele normal, foi formada em abundância e em curto espaço de tempo.

No âmbito metabólico ou funcional, é possível que, durante as fases mais precoces da cicatrização, possa ter havido uma redução na taxa de depuração do metabólito induzido pela droga, a PpIX, conseqüentemente, causando aumento na sua concentração. Como a demanda mais crítica durante essa fase da cicatrização é o processo de proliferação e de epitelização, pode ter havido um desvio metabólico para essas 'tarefas', causando redução ou até anulação na depuração ou metabolização da droga, como medida de preservação da integridade do organismo.

Após o dia 11 de PO, a fluorescência do ferimento com MAL (+/+) decai significativamente. Esse decaimento da fluorescência pode ser relacionado, também, à redução do processo de proliferação epitelial, reduzindo o volume da epiderme e dos anexos epiteliais, dado este corroborado, ainda, pelos achados de imunoistoquímica (PCNA). Além disso, esse decaimento pode, ainda, ser relacionado às alterações no tecido conjuntivo. Inicialmente, tem-se um tecido rico em anexos (fase inicial da cicatrização) que, gradativamente, ao longo do tempo, especialmente após o primeiro mês de PO, transforma-se em um tecido fribrotico ou esclerótico, com tecido colágeno densamente compactado e, em detrimento disso, não há restauração dos anexos, que se tornam escassos ou ausentes nessa fase tardia. Portanto, a desproporção dos constituintes dérmicos, fibras de colágeno e anexos epidérmicos, seria o principal fator

relacionado à diminuição da IF da lesão (+/+) a partir da do dia 11 de PO e, especialmente, após completa epiteliação da mesma.

Após queda acentuada dos valores de IF da lesão (+/+), o sinal de fluorescência não apresenta diferenças significativas a partir do dia 34 de PO, consistente com a estabilidade dos achados histológicos e imunoistoquímicos. Durante esse período, tanto as análises qualitativas quanto quantitativas das lâminas (HE, *Picrosírius* e PCNA) não mostraram diferença estrutural até o último dia analisado (76 DPO).

Todas as inferências acima relacionadas, sobretudo no que diz respeito à correlação entre a IF e os achados da microscopia convencional e imunoistoquímica, puderam ser confirmadas pela microscopia de fluorescência. Imagens em grande aumento mostraram expressão celular da fluorescência, presente e marcante no tecido epitelial, ou seja, epiderme e conteúdo anexial. Baixos sinais foram encontrados ao longo da derme profunda, onde há depósito de colágeno. Nas fases mais avançadas da cicatrização, quando o sinal de fluorescência foi baixo, a comparação entre cortes congelados e corados em HE, mostram que a área escura, com baixa fluorescência, foi relacionada ao aumento do conteúdo de colágeno na derme do centro da lesão.

O achado de maior fluorescência na epiderme e nos anexos epiteliais, está em acordo com outras pesquisas atuais, como no trabalho de Sakamoto e colaboradores (2011). Além disso, tem sido mostrado que é clara a distinção entre a origem do sinal de fluorescência epidérmica e dérmica (Gillies *et al.*, 2000). Outros estudos, mostraram, ainda, que ALA e seus derivados ésteres, como MAL, induzem o acúmulo de PpIX de forma quase exclusiva na epiderme (e anexos) e não na derme (Peng *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2011; Angell-Petersen *et al.*, 2007), de acordo com o presente trabalho.

Além disso, trabalhos *in vitro* que coletaram fluorescência da PpIX em camadas separadas da pele, concluíram que materiais amorfos, como o interstício dérmico, apresentam baixas concentrações de PpIX (De Bruijin *et al.*, 2008), o que corrobora a ideia de que a derme influencia pouco no valores de

fluorescência. Outra evidência é o fato de haver, no presente trabalho, valores de colágeno crescentes significativamente ao longo da cicatrização, sem qualquer correlação com os valores de fluorescência apresentados, em ambos os grupos.

Nesse contexto, apesar do colágeno ser fluorogênico, absorve luz visível e emite fluorescência, este não pareceu afetar a intensidade de fluorescência ao longo dos dias avaliados e, por isso, não foi realizada a quantificação específica das suas fibrilas, tipo I e III, de acordo com a coloração sob luz polarizada. Dessa maneira, a contagem foi feita e apresentada em conjunto.

Deve-se questionar, ainda, se o pico dos valores de fluorescência que ocorre no dia 11 deve-se: a) à presença do coágulo na primeira semana, que atuaria minimizando a IF que deveria ser maior; b) à intensa proliferação e formação de tecido epitelial que se tornam mais evidentes nessa fase ou c) ambos os processos participantes em conjunto. O que se faz mais plausível é a última hipótese, pois, de acordo com os demais trabalhos da área, a fluorescência depende de vários fatores teciduais, que atuam interligados.

O exato mecanismo envolvido na distribuição de PpIX em diferentes tecidos é incerto. Os trabalhos revisados que abordam o tema, procuram encontrar uma explicação para a variação de IF apresentada por tecidos alterados. Apesar disso, o exato mecanismo ainda não foi estabelecido; são feitas proposições de alterações no metabolismo da PpIX, resultantes de uma combinação de alta atividade da enzima Porfobilinogênio Deaminase e baixa atividade de Ferroquelatase na lesão de pele (Juzenas *et al.*, 2002b). Além disso, maior penetrabilidade de moléculas de ALA e seus derivados foram implicados em altas temperaturas presentes na lesão (Moan *et al.*, 1999).

Limitações do presente trabalho:

- O animal ou modelo utilizado, pode influenciar na variação da IF, devido a particularidades na farmacocinética e biodistribuição da molécula fluorescente em estudo, no caso, PpIX (van Staveren *et al.*, 2001). Portanto, a extrapolação dos dados para outros animais e espécies, deve ser cautelosa.

- Na comparação da IF ao longo do tempo, deve ser levado em consideração que foram utilizados mais de um lote da medicação. Apesar de se tratar de medicação industrializada, padronizada e controlada, também, está passível de alterações entre os lotes. Durante o nosso experimento, foram utilizados 5 (cinco) lotes de MAL a 16% em creme. Acrescenta-se a isso, o fato de alguns terem sido utilizados em mais de um experimento e terem sido armazenados em refrigerador, conforme orientação do fabricante do medicamento. Porém, segundo o mesmo, o produto deve ser utilizado apenas por curtos períodos após ser aberto, sob pena de perder poder farmacológico intrínseco (no caso, poder fluorogênico).

- Um outro fator importante está relacionado com as propriedades ópticas do tecido biológico estudado, a pele, na qual fatores primordiais como estruturas celulares e histológicas, componentes moleculares, fluoróforos endógenos presentes, conforme citado anteriormente, são capazes de influenciar nos valores coletados durante o experimento (Wheeland, 1995; Welch *et al.*, 1997).

- Outro fator importante diz respeito às condições em que o experimento é realizado, como som, horário e transporte dos animais para experimentação; como potenciais causadores de estresse aos mesmos e devem ser considerados na análise dos dados apresentados.

- Soma-se a esses fatores que, ao aplicarmos o MAL tópico nos camundongos, mesmo com a colocação de curativo protetor (Tegaderm®) foi observada a manipulação da região onde o creme fora aplicado, tanto pelo próprio animal como pelos demais animais da gaiola. Fato que não poderia ser

evitado, com exceção de anestesia por tempo prolongado, o que se tornaria inviável pelo tempo de exposição do animal ao anestésico e desenho experimental com análise periódica, ocasionando grande risco de parada respiratória e morte.

- Igualmente importante mostrou-se o processo de cicatrização da pele dos camundongos, o qual pode ter sido parcialmente alterado ou retardado, devido à manipulação da ferida cirúrgica pelos animais; fato esse frequente em todos os ferimentos cirúrgicos realizados em animais. Observou-se, inclusive, a retirada precoce dos pontos por parte dos animais após manipulação local. Apesar de todos esses fatores, nenhum animal apresentou alterações macroscópicas da cicatrização, sobretudo, no que concerne a processos infecciosos ou supurativos.

- Cita-se, ainda, que a coleta dos valores de fluorescência era muito breve para cada animal. Dessa forma, não havia o risco inerente à medicação, quanto ao efeito fotodinâmico ou fototóxico intrínseco, que ocorre apenas quando altas doses de luz são administradas por tempo prolongado. A esse procedimento, dá-se o nome de terapia fotodinâmica ou PDT, do inglês, *photodynamic therapy*. Tal terapêutica tem por objetivo final, a destruição tecidual e, portanto, vem sendo utilizada, na maioria das vezes, em doenças proliferativas, como é o caso das neoplasias ou cânceres de pele. Mas, como foi dito e está descrito na literatura (Gambichler *et al.*, 2008; Wetzig *et al.*, 2010): breves exposições à luz de excitação, minimiza a fotodegradação da PpIX e suprimem completamente os efeitos fototóxicos, por limitação na produção de espécies reativas de oxigênio (Kleinpenning *et al.*, 2010).

- Além do exposto acima, ressalta-se, ainda, que baixas doses de luz estão sendo estudadas como ótimas promotoras do processo de cicatrização, sendo esse princípio estudado e aplicado em protocolos de cicatrização de úlceras crônicas da pele, como no trabalho de Silva e colaboradores (2004). Apesar disso, o presente protocolo, não teve por objetivo avaliar a capacidade de aceleração do processo de cicatrização da pele dos animais e não foram

observadas alterações nos tempos de cicatrização entre os grupos avaliados, sejam elas limitantes ou promotoras do processo. Ressalta-se também que os estudos que pretendem acelerar o processo de cicatrização da pele por meio do emprego de medicação tópica associado ao emprego de fonte luminosa, têm sido desenvolvidos por meio de outras substâncias, não derivadas do ALA.

- Vale destacar que, através da análise histológica tecidual, foi comprovada que não houve aceleração ou retardo no processo de cicatrização com a técnica empregada. Assim, ambos os grupos mostraram valores semelhantes, portanto, não apresentaram diferenças significativas nos diversos constituintes nas diversas fases avaliadas. Porém, quando comparados os valores teciduais dos animais no mesmo tempo operatório, são encontradas diferenças sutis (não significativas). Essas diferenças são biologicamente entendíveis e aceitáveis, uma vez que cada organismo tem um metabolismo próprio.

- Deve-se mencionar que, no estado atual de desenvolvimento de técnicas de EF, há uma penetração limitada da luz azul nos tecidos, restringindo a profundidade da pele onde a luz é capaz de atingir, girando em torno de 0.5 mm o que corresponderia, em humanos, à derme papilar ou derme superficial. Assim, em regiões de pele mais espessa, como, por exemplo palmas ou plantas (humanos) ou em situações de irregularidades de superfície como as articulações, orelhas e regiões de dobras, a técnica apresenta limitações importantes.

- Outra limitação que deve ser citada, é a aplicabilidade da técnica no estudo de processos de cicatrização alterados por processos patológicos, seja infecciosos ou de aberrações proliferativas, como os quelóides, já que, no presente trabalho, foi empregada a técnica em animais que apresentaram processo de cicatrização dentro do curso natural e, portanto, sem complicações. A extrapolação dos conhecimentos para outras condições diferentes da fisiológica deve ser cautelosa.

- Deve-se levar em consideração, também, que apesar de os animais terem sido submetidos à anestesia inalatória durante as coletas dos valores de fluorescência com a intenção de restringir o movimento dos mesmos, eles permaneciam com movimento de respiração preservados (inspiração e expiração). Esse simples movimento respiratório, era responsável por discreta elevação e rebaixamento da região tóraca e, por serem animais de pequeno porte, ocasionava movimentação de todo o tronco e, assim, da região que estava sendo avaliada, o dorso. Tal fato pode ter levado a pequenos erros ou artefatos de movimento, que, durante as coletas, foram minimizados ao máximo e, com os resultados apresentados, mostrando diferenças significativas, leva a crer que os erros de coleta foram pontuais e experimentais.

- Outro fator a ser citado como passível de interferência nas coletas, foi o uso de O₂ associado ao isoflurano no processo de indução anestésica. Esse gás, em maior concentração no organismo vivo, pode causar alterações metabólicas e, portanto, poderia alterar a depuração da PpIX em relação a um organismo não anestesiado com essa técnica.

- Outro ponto importante a ser mencionado é o fator limitante das análises do presente trabalho, especialmente quando há tentativa de correlacionar com os demais resultados da revisão da literatura. Os conhecimentos acerca do tema são muito recentes e, em virtude disso, são escassos os trabalhos publicados, soma-se a esse fato, que a maioria deles utiliza metodologias e procedimentos diferentes o que dificulta a comparação dos resultados. Autores que abordam o tema, citam a mesma dificuldade e, ainda, justificam que resultados diferentes podem ocorrer por diferenças no desenho do protocolo (Smits *et al.*, 2009).

- No presente trabalho, na revisão da literatura, buscou-se a correlação da IF da PpIX a tecidos epiteliais em geral, ou seja, incluindo tecido não-cutâneo. É provável que diferentes tecidos epiteliais se comportem de maneira semelhante na metabolização da PpIX, mas o real entendimento é limitado e difícil. O avanço da técnica de EF pode estar restrito pela escassez de estudos básicos

sobre a PplX, tais como estudos em cultura de células. Baseando-se nessas considerações, sugere-se, no presente trabalho, que novos métodos de estudo mais apurados sobre a biodisponibilidade da droga e seu metabólito fluorescente (PplX) sejam realizados.

- Cita-se, ainda, que a técnica de Espectroscopia de Fluorescência apresentada é bastante sensível à manipulação e está diretamente relacionada ao treinamento do observador quanto ao posicionamento da sonda de coleta. Posicionamento que pode, eventualmente, ser realizado com pequenas diferenças de um dia para outro se não tiver seus parâmetros rigorosamente repetidos durante o experimento. Ou seja, pode-se dizer que a técnica descrita depende da experiência em utilizar o material de maneira adequada e criteriosa.

- Por fim, deve-se ressaltar que os achados de IF encontrados na EF são valores numéricos, e que estes devem sempre ser comparados aos valores de IF da pele normal adjacente, como medida comparativa, já que existem variações individuais e que dependem da região estudada (devido às particularidades –da pele- de cada região do corpo). Além disso, é fundamental para a qualidade da técnica, uma análise minuciosa da apresentação da lesão e suas particularidades, pois, é evidente que as características observadas são fundamentais também na interpretação sobre o tempo da lesão. Portanto, sabe-se que a técnica de EF é complementar, ou seja, é auxiliar aos métodos comuns de exame macroscópico e, jamais, deve ser usada em substituição desta.

Perspectivas Futuras

O presente modelo de estudo de cicatrização cutânea mostra resultados promissores. Uma vez que esta técnica se torne suficientemente compacta, de baixo custo e amplamente estudada em novas pesquisas, poderá servir como ferramenta adicional na análise de alterações de tecidos epiteliais, em especial a pele. Essa técnica poderá evitar biópsias desnecessárias em investigação diagnóstica clínica ou criminal.

O trabalho foi desenvolvido para facilitar o entendimento da fluorescência da pele relacionada à aplicação tópica de MAL, caracteristicamente no processo de cicatrização de feridas na pele. O desenvolvimento de novas técnicas de análise da fluorescência cutânea em condições fisiológicas e patológicas pode ajudar no entendimento de etapas cruciais da inflamação, formação de cicatriz e diagnósticos futuros de doenças de pele. Novas moléculas fluorescentes podem ser estudadas e desenvolvidas, tornando-se marcadores específicos, com o objetivo de tornar a técnica de EF uma ferramenta muito útil às ciências biomédicas e à medicina.

Nesse contexto, entende-se que em diversas situações clínicas de acompanhamento de doentes, biópsias repetidas e múltiplas de pele podem acarretar um ônus significativo para os pacientes. Por essa razão, técnicas não-invasivas devem ser estudadas na tentativa de se chegar a um método mais fidedigno de diagnóstico para o tecido cutâneo, mostrando-se ferramenta de valor considerável.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A técnica de EF com utilização de MAL tópico permitiu distinguir a pele lesionada da pele sã adjacente na maioria dos dias avaliados durante os 3 (três) primeiros meses de pós-operatório.

Na fase recente da cicatrização, associando-se a técnica de EF ao exame clínico da lesão, foi possível estimar se a lesão encontrava-se antes, durante ou após 10 dias de pós-operatório.

Através dessa técnica, foi possível diferenciar feridas ou lesões cicatriciais com menos de um mês, daquelas com mais de um mês de duração.

A EF com MAL, permitiu uma correlação histológica:

- positiva entre a IF e as espessuras e volumes epiteliais, ou seja, as camadas epidérmicas, córnea e os anexos epiteliais;
- negativa entre a IF e os volumes de coágulo e de colágeno.

Em resumo, pode-se concluir que:

A EF, técnica não-invasiva, aplicada à análise do tecido cutâneo em regeneração, permitiu adequada estimativa da idade de lesão em cicatrização e, ainda, mostrou correlação entre seus valores de fluorescência aos achados histológicos, em especial, o tecido epitelial.

O conhecimento apresentado pode ser útil em outras condições clínicas de acentuação ou atenuação de respostas epidérmicas e, ainda, serem extrapoladas para outros tecidos vivos.

Anexos

ANEXO A – Aprovação pelo comitê de ética do IQ-USP

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM CAUNDONGOS ATRAVÉS DA MEDIDA DA FLUORESCÊNCIA CUTÂNEA APÓS APLICAÇÃO TÓPICA DE METIL-AMINOLEVULINATO 16%(MAL-Metix®)”, desenvolvido sob responsabilidade do **Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista** em colaboração com o Dr. Daniel Romero Munoz e Roberta Marinho Falcão Gondim (doutoranda), está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA), do IQ-USP, em 13/05/2009.

We attest that the project entitled “AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM CAUNDONGOS ATRAVÉS DA MEDIDA DA FLUORESCÊNCIA CUTÂNEA APÓS APLICAÇÃO TÓPICA DE METIL-AMINOLEVULINATO 16%(MAL-Metix®)”, developed under the responsibility of Dr. **Maurício da Silva Baptista** in collaboration with Dr. Daniel Romero Munoz e Roberta Marinho Falcão Gondim (student), is agreement with the Ethical Principals in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 5/13/2009.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Prof. Dra. Nadja C. de Souza P. Lardner
Coordenadora CECUA

ANEXO B – Aprovação pelo comitê de ética do HC-FMUSP (CAPPesq)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

22/11

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0700/09, intitulado: "AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS HAIR LESS ATRAVÉS DA MEDIDA DA FLUORESCÊNCIA CUTÂNEA APÓS APLICAÇÃO TÓPICA DE METIL- AMINOLEVULINATO (MAL- METVIX®)." apresentado pelo Departamento de MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO TRABALHO.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Daniel Romero Muñoz**

Pesquisador (a) Executante: **Roberta Marinho Falcão Gondim**

CAPPesq, 16 de Julho de 2009

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 23/10/09

Prof. Dra. **Elia Garcia Caldini**
Programa Fisiopatologia Experimental
Pós-Graduação em Ciências
Coordenador

PROF. DR. **CLAUDIO LEONE**
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

ANEXO C – Mudança de pesquisa de mestrado para doutorado (ciência CAPPesq)

CIÊNCIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22/06/2011, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0700/09**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS HAIR LESS ATRAVÉS DA MEDIDA DA FLUORESCÊNCIA CUTÂNEA APÓS APLICAÇÃO TÓPICA DE METIL- AMINOLEVULINATO (MAL- METVIX®)."** apresentado pelo Departamento de **MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO TRABALHO**.

•Carta datada de 16/05/11 - Carta de mudança de nível de Mestrado para Doutorado direto; Relatório das atividades desenvolvidas na pós-graduação; Dissertação de Mestrado e Projeto de doutorado.

Pesquisador (a) Responsável: **Daniel Romero Muñoz**

CAPPesq, 27 de Junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO D – Aprovação da mudança de título da pesquisa (CAPPesq)

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0700/09

Título: AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: FLUORESCÊNCIA E ESTEREOLOGIA

Pesquisador Responsável: Daniel Romero Muñoz

Pesquisador Executante: Roberta Marinho Falcão Gondim

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO TRABALHO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 07/03/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 30/01/12 - Solicitação de mudança de título do projeto para:
Avaliação da Cicatrização Cutânea: Fluorescência e Estereologia

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 12 de Março de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Referências

8 REFERÊNCIAS

Amadeu T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, Porto LC, Desmoulière A, Costa A. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract*. 2003;199:469-73.

Andersson-Engels S, Canti G, Cubeddu R, Eker C, af Klinteberg C, Pifferi A, Svanberg K, Svanberg S, Taroni P, Valentini G, Wang I. Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal carcinomas of the skin. *Laser Surg and Med*. 2000;26:76-82.

Andersson PS, Montán S, Persson T, Svanberg S, Tapper S, Karlsson SE. Fluorescence endoscopy instrumentation for improved tissue characterization. *Med Phys*. 1987;14:633-6.

Angell-Petersen E, Christensen C, Müller CR, Warloe T. Phototoxic reaction and porphyrin fluorescence in skin after topical application of methyl aminolaevulinate. *Br J Dermatol*. 2007;156:301-7.

Asawanonda P, Taylor CR. Wood's light in dermatology. *Int J Dermatol*. 1999;38:801-7.

Bauer J, Bahmer FA, Wörl J, Neuhuber W, Schuler G, Fartasch M. A strikingly constant ratio exists between Langerhans cells and other epidermal cells in human skin. A stereologic study using the optical disector method and the confocal laser scanning microscope. *J Invest Dermatol*. 2001;116:313–8.

Bohnert M, Schulz K, Belenkaia L, Liehr AW. Re-oxygenation of haemoglobin in livores after post-mortem exposure to a cold environment. *Int J Legal Med*. 2008;122:91-6.

Bracaleon L, Durkin AJ, Tu JH, Menaker G, Fallon JD, Kollias N. *In vivo* fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2001;73:178-83.

Brahmatewari J, Serafini A, Serralta V, Mertz PM, Eaglstein WH. The effects of topical transforming growth factor-beta2 and anti-transforming growth factor-beta2,3 on scarring in pigs. *J Cutan Med Surg*. 2000;4:126-31.

Bruengger A, Heilbronner R, Anderegg M, Hubler M, Rohr HP. Human skin grafts on nude athymic mice: a light microscopic stereological study. *Arch Dermatol Res*. 1984;276:78–81.

Bugaj A, Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Ma LW, Moan J. The effect of skin permeation enhancers on the formation of porphyrins in mouse skin during topical application of the methyl ester of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83:94-7.

Burugapalli K, Pandit A. Characterization of tissue response and in vivo degradation of cholecyst-derived extracellular matrix. *Biomacromolecules*. 2007;8:3439-51.

Canpolat M, Mourant JR. Monitoring photosensitizer concentration by use of a fiber-optic probe with a small source-detector separation. *Applied Optics*. 2000;39:6508-14.

Chadwick DL. The diagnosis of inflicted injury in infants and young children. *Del Med J*. 1997;69:345-54.

Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12877-82.

Cherem A J. Medicina e Arte: observações para um diálogo interdisciplinar. *Acta Fisiatr*. 2005;12:26-32.

Chu DH. Development and structure of skin. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. In: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. Mc Graw Hill; 2008. Cap. 7, p. 57-73.

Chu SC, Chiang HK. Monte Carlo simulation of fluorescence spectra of normal and dysplastic cervical tissues for optimizing/receiving arrangements. *Appl Spectrosc*. 2010;64:708-13.

Clarck RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*. 1982;79:264-9.

Cong AX, Hofmann MC, Cong W, Xu Yong, Wang G. Monte Carlo fluorescence microtomography. *J Biomed Opt*. 2011;16:070501-1-070501-3.

Coulter K. Bruising and skin trauma. *Pediatr Rev*. 2000;21:34-5.

Dângelo JG, Fattini CA. *Anatomia Humana Básica*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. p.173-6.

De Bruijn HS, Meijers C, van der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenborg HJ, Robinson DJ. Microscopic localisation of protoporphyrin IX in normal mouse skin

after topical application of 5-aminolevulinic acid or methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B*. 2008;92:91-7.

De Rosa FS, Lopez RF, Thomazine JA, Tedesco AC, Lange N, Bentley MV. *In vitro* metabolism of 5-ALA esters derivatives in hairless mice skin homogenate and *in vivo* PpIX accumulation studies. *Pharmaceut Res*. 2004;21:2247-52.

Dimitrow E, Riemann I, Ehlers A, Koehler MJ, Norgauer J, Elsner P, König K, Kaatz M. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Exp Dermatol*. 2009;18:509-15.

Dobrev H. Fluorescence diagnostic imaging in patients with acne. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2010;26:285-9.

Dognitz N, Salomon D, Zellweger M, Ballini JP, Gabrecht T, Lange N, van den Bergh H, Wagnières G. Comparison of ALA and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma. *J Photochem Photobiol B*. 2008;93:140-8.

Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers Med Sci*. 2008;23:361-7.

Ellingsen A R, Sørensen FB, Larsen J O, Deleuran MS, Thestrup-Pedersen K. Stereological quantification of lymphocytes in skin biopsies from atopic dermatitis patients. *Acta Derm Venereol*. 2001;81:258-62.

Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366:1736-43.

Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO. Cancer detection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1948;68:640-1.

França GV. Fundamentos de Medicina Legal. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2005.

Fulton JE Jr. Utilizing the ultraviolet (UV Detect) camera to enhance the appearance of photodamage and other skin conditions. *Dermatol Surg*. 1997;23:163-9.

Furuzawa SK, Zangaro RA, Nicolau RA, Pacheco MTT. Distribution of Protoporphyrin IX (PpIX) induced by aminolevulinic acid (5-ALA) in the skin and

liver of rats. In: Optical Methods for tumor treatment and detection mechanisms and techniques in photodynamic therapy, 8: Proceeding. Bellingham: SPIE. 1999;3592:89-93 (<http://dx.doi.org/10.1117/12.351510>).

Gade TP, Motley MW, Beattie BJ, Bhakta R, Boskey AL, Koutcher JÁ, Mayer-Kuckuk P. Imaging of alkaline phosphatase activity in bone tissue. Plos One. 2011;6:e22608.

Gambichler T; Moussa G; Altmeyer P. A pilot study of fluorescence diagnosis of basal cell carcinoma using a digital flash light-based imaging system. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2008;24:67–71.

Garcia Y, Wilkins B, Collighan RJ, Griffin M, Pandit A. Towards development of a dermal rudiment for enhanced wound healing response. Biomaterials. 2008;29:857-68.

Garg A, Levin N A, Bernhard JD. Structure of Skin Lesions and Fundamentals of Clinical Diagnosis. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. In: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 7th ed. Mc Graw Hill, 2008.Cap.4, p.23-40.

Ghohestani RF, Li K, Rousselle P, Uitto J. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. Clin Dermatol. 2001;19:551.

Gillies R, Zonios G, Anderson RR, Kolas N. Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin *in vivo*. J Invest Dermatol. 2000;115:704-7.

Greaves M, Camp RD. Prostaglandins, leukotrienes, phospholipase, platelet activating factor, and cytokines: an integrated approach to inflammation of human skin. Arch Dermatol Res. 1988;280 Suppl S33-41.

Grellner W, Vieler S, Madea B. Transforming growth factors (TGF- α and TGF- β) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. Forensic Sci Int. 2005;153:174-80.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS. 1988;96:379-94.

Gundersen HJ, Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. J Microsc. 1981;121:65-73.

Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. *Int J Legal Med*. 2004;118:320-5.

Hercules, H.C. *Medicina Legal – Texto e Atlas*. São Paulo: editora Atheneu; 2005.

Hern S, Stanton AW, Mellor RH, Harlan CC, Levick JR, Mortimer PS. In vivo quantification of the structural abnormalities in psoriatic microvessels before and after pulsed dye laser treatment. *Br J Dermatol*. 2005;152:505–11.

Holst D, Grimaldi PA. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:241-5.

Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy*. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific. 2005.

Iida N, Grotendorst GR. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol*. 1990;10:5596-9.

ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>).

Iozzo RV. Heparan sulfate proteoglycans: Intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest*. 2001;108:165-7.

Izadi K, Ganchi P. Chronic wounds. *Clin Plast Surg*. 2005;32:209-22.

Izzo AD, Mackanos MA, Beckham JT, Jansen ED. In vivo optical imaging of expression of vascular endothelial growth factor following laser incision in skin. *Laser Surg Med* 2001; 29:343-50.

Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur Urol*. 2008;53:1138–48.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 5a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1985:381-94.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histol J*. 1979;11:447-55.

Juzenas P, Juzeniene A, Stakland S, Iani V, Moan J. Photosensitizing effect of protoporphyrin IX in pigmented melanoma of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002a;297:468-72.

Juzenas P, Sharfaei S, Moan J, Bissonnette R. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumors and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester. *J Photochem Photobiol.* 2002b;67:11-17.

Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. Topical application of 5-aminolaevulinic acid, methyl 5-aminolaevulinate and hexyl 5-aminolaevulinate on normal human skin. *Br J Dermatol.* 2006;155:791-9.

Kamp S, Jemec GBE, Kemp K, Kjeldsen, Stenderup K, Pakkenberg B, Dam TN. Application of stereology to dermatological research. *Exp Dermatol.* 2009;18:1001-9.

Kanick SC, van der Leest C, Djamin RS, Janssens AM, Hoogsteden HC, Sterenborg HJ, Amelink A, Aerts JG. Characterization of mediastinal lymph node physiology in vivo by optical spectroscopy during endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *J Thorac Oncol.* 2010;5:981-7.

Karvinen S, Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JM, Pienimäki JP, Törrönen K, Jokela TA, Tammi MI, Tammi R. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem.* 2003;278:49495-504.

Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Sur.* 1996;14:289-304.

Khozani TT, Noorafshan A, Nikeghbalian S, Panjeh-Shahin MR, Dehghani F, Azizi M, Tanideh N. Stereologic study of the effects of prostaglandin E2 on the induction of angiogenesis in full-thickness skin autografts. *Adv Skin Wound Care.* 2004;17:202-4.

Kielty CM, Shuttleworth CA. Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech.* 1997;38:413-27.

Kirkpatrick ND, Zou C, Brewer MA, Brands WR, Drezek RA, Utzinger U. Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring. *Photochem Photobiol.* 2005;81:125-34.

Kleinpenning MM, Smits T, Ewalds E, van Erp PE, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ. Heterogeneity of fluorescence in psoriasis after application of 5-aminolaevulinic acid: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol.* 2006;155:539-45.

Kleinpenning MM, Wolberink EW, Smits T, Blokk WAM, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ, Gerritsen RMJP. Fluorescence diagnosis in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2010;26:297–302.

Kondo, T. Timing of skin wounds. *Legal Med*. 2007;9:109-14.

Koutnikova H, Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann Med*. 2001;33:556-61.

Langer S, Born F, Hatz R, Biberthaler P, Messmer K. Orthogonal polarization spectral imaging versus intravital fluorescent microscopy for microvascular studies in wounds. *Ann Plast Surg*. 2002;48:646-53.

Laurenza D. O Inventor do renascimento. *Scientific American*, Coleção Gênios da Ciência, nº 02, São Paulo: Duetto Editorial LTDA, 2005.

Lee CY, Kim KH, Kim YH. The efficacy of photodynamic diagnosis in defining the lateral border between a tumor and a tumor-free area during Mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg*. 2010;36:1704–10.

Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975;78:71-100.

Liu N, Chen Y, Huang X. Fibronectina EIIIA splicing variant: a useful contribution to forensic wounding interval estimation. *Forensic Sci Int*. 2006;162:178-82.

Luster AD, Cardiff RD, MacLean JA, Crowe K, Granstein RD. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc Assoc Am Physician*. 1998;110:183-96.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75:469-86.

Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*. 2004;131:3021-24.

McGaw WT, Ten Cate AR. A role for collagen phagocytosis by fibroblasts in scar remodeling: an ultrastructural stereologic study. *J Invest Dermatol*. 1983;81:375-8.

McGee S, Mardirossian V, Elackattu A, Mirkovic J, Pistey R, Gallagher G, Kabani S, Yu CC, Wang Z, Badizadegan K, Grillone G, Feld MS. Anatomy-

based algorithms for detecting oral cancer using reflectance and fluorescence spectroscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118:817-26.

Moan J, Berg K, Gadmar OB, Iani V, Ma L, Juzenas P. The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues. *Photochem Photobiol*. 1999;70:669-73.

Mokřý M, Gál P, Vidinský B, Kusnřr J, Dubayov K, Mozes S, Sabo J. *In vivo* monitoring the changes of interstitial pH and FAD/NADH ratio by fluorescence spectroscopy in healing skin wounds. *Photochem Photobiol*. 2006;82:793-7.

Mouton, PR. Principles and Practices of Unbiased Stereology: An Introduction for Bioscientists. The Johns Hopkins University Press, 2002.

Murphy GF. Histology of the skin. *Lever's Histopathology of the Skin*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins;2005.Cap.3,p.10-51.

Nahm WK, Philpot BD, Adams MM, Badiavas EV, Zhou LH, Butmarc J, Bear MF, Falanga V. Significance of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated signaling in human keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2004;200:309-17.

Navarro FA, So PT, Nirmalan R, Kropf N, Sakaguchi F, Park CS, Lee HB, Orgill DP. Two-photon confocal microscopy: a nondestructive method for studying wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114:121-8.

Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*. 1982;156:430-42.

Ninomiya T, Itoh Y, Tajima S, Ishibashi A. *In vitro* and *in vivo* expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives. *J Dermatol Sci*. 2001;27:114-20.

Nishiyama T, Kii I, Kashima TG, Kikuchi Y, Ohazama A, Shimazaki M, Fukayama M, Kudo A. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2011;6:e18410.

Nowakowski Z, Stelmachow J, Spiewankiewicz B, Gerulewicz G. Diagnostic value of the PDD method in evaluation of vulvar lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26:75–8.

Packer L, Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*. 1977;267:423-5.

Pan YA, Sanes JR. Non-invasive visualization of epidermal responses to injury using a fluorescent transgenic reporter. *J Invest Dermatol*. 2004;123:888-91.

Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinelli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31:401-7.

Payne G, Langlois N, Lennard C, Roux C. Applying visible hyperspectral (chemical) imaging to estimate the age of bruises. *Med Sci Law*. 2007;47:225-32.

Peng Q, Soler AM, Warloe T, Nesland JM, Giercksky KE. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol*. 2001;62:140-5.

Psaroudakis K, Tzatzarakis MN, Tsatsakis AM, Michalodimitrakis MN. The application of histochemical methods to the age evaluation of skin wounds: experimental study in rabbits. *Am J Forensic Med Pathol*. 2001;22:341-5.

Ramasasthy SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg*. 2005;32:195-208.

Randeberg LL, Haugen OA, Haaverstad R, Svaasand LO. A novel approach to age determination of traumatic injuries by reflectance spectroscopy. *Laser Surg Med*. 2006;38:277-89.

Ricketts S-A, Sibbons PD, Green CJ. Quantitative analysis of the development of experimentally induced post surgical adhesions: a microstereological study. *Int J Exp Pathol*. 1999;80:325-34.

Robinson JK. Use of digital epiluminescence microscopy to help define the edge of lentigo maligna. *Arch Dermatol*. 2004;140:1095-100.

Roy HK, Gomes AJ, Ruderman S, Bianchi LK, Goldberg MJ, Stoyneva V, Rogers JD, Turzhitsky V, Kim Y, Yen E, Jameel M, Bogojevic A, Backman V. Optical measurement of rectal microvasculature as an adjunct to flexible sigmoidoscopy: gender-specific implications. *Cancer Prev Res*. 2010;3:844-51.

Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res*. 2005;304:274-86.

Sakamoto FH, Doukas AG, Farinelli WA, Tannous Z, Smith NA, Zurakowski D, Anderson RR. Intracutaneous ALA photodynamic therapy: dose-dependent targeting of skin structures. *Laser Surg Med* 2011; 43:621–631.

Sharfaei S, Juzenas P, Moan J, Bissonnette R. Weekly topical application of methyl aminolevulinate followed by light exposure delays the appearance of UV-induced skin tumours in mice. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:237-42.

Silva JC, Lacava ZG; Kuckelhaus S; Silva LP; Neto LF ; Sauro EE, Tedesco AC. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing. *Lasers Surg Med.* 2004;34:451-7.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341:738, 1999.

Smits T, Robles CA , van Erp PE, van de Kerkhof PCM, and Gerritsen MJ. Correlation between macroscopic fluorescence and protoporphyrin IX content in psoriasis and actinic keratosis following application of aminolevulinic acid. *J Invest Dermatol.* 2005;125:833–9.

Smits T, Kleinpenning MM, van Erp PE, van de Kerkhof PCM and Gerritsen MJ. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006;155:429–36.

Smits T, van Laarhoven AI, Staassen A, van de Kerkhof PC, van Erp, Gerritsen MJ. Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol.* 2009;160:849–57.

Sorg H, Krueger C, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat.* 2007;211:810-18.

Stamatas GN, Estanislao RB, Suero M, Rivera ZS, Li J, Khaiat A, Kollias N. Facial skin fluorescence as a marker of the skin's response to chronic environmental insults and its dependence on age. *Br J Dermatol.* 2006;154:125-32.

Stenquist B, Ericson MB, Strandeberg C, Mölne L, Rosén A, Larkö O, Wennberg AM. Bispectral fluorescence imaging of aggressive basal cell carcinoma combined with histopathological mapping: a preliminary study indicating a possible adjunct to Mohs micrographic surgery. *Br J Dermatol.* 2006;154:305-9.

Stephenson T. Ageing of bruising in children. *J R Soc Med.* 1995;90:312-4.

Svanberg K, af Klinteberg C, Nilsson A, Wang I, Andersson-Engels S, Svanberg S. Laser-based spectroscopy methods in tissue characterization. *Ann NY Acad Sci.* 1998;838:123-9.

Takamiya M, Saigusa K, Kumagai R, Nakayashiki N, Aoki Y. Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation. *Int J Legal Med.* 2005;119:16-21.

Thomsen S. Anatomic and physiologic factors influencing transcutaneous optical diagnosis of deep-seat lesions. In: *Optical Biopsy, 2: Proceeding.* Bellingham. SPIE. 1998;3250:130-9.

van den Akker JT, Iani V, Star WM, Sterenborg HJ, Moan J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem Photobiol.* 2000;72:681-9.

van Staveren HJ, Speelman OC, Witjes MJ, Cincotta L, Star WM. Fluorescence imaging and spectroscopy of ethyl nile blue A in animal models of (pre) malignancies. *Photochem Photobiol.* 2001;73:32-8.

Vitellaro-Zuccarello L, Dyne K, Cetta G. Biochemical, morphological and stereological study of the dermis in three members of a large family with type IV Ehlers–Danlos syndrome. *Connect Tissue Res.* 1989;23:1–17.

Weibel ER, Fleischner Lecture. Looking into the lung: what can it tell us? *AJR Am J Roentgenol.* 1979;133:1021-31.

Weingarten MS, Papazoglou ES, Zubkov L, Zhu L, Vorona G, Walchack A. Measurement of optical properties to quantify healing of chronic diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* 2006;14:364-70.

Weingarten MS, Papazoglou ES, Zubkov L, Zhu L, Neidrauer M, Savir G, Peace K, Newby JG, Pourrezaei K. Correlation of near infrared absorption and diffuse reflectance spectroscopy scattering with tissue neovascularization and collagen concentration in a diabetic rat wound healing model. *Wound Repair Regen.* 2008;16:234-42.

Welch A, Gardner C, Richards-Kortum R, Chan E, Criswell G, Pfefer J, Warren S. Propagation of fluorescent light. *Laser Surg Med.* 1997;21:166-78.

Wennberg AM, Larkö O, Lönnroth P, Larson G, Krogstad AL. Delta-aminolevulinic acid in superficial basal cell carcinoma and normal skin – a microdialysis and perfusion study. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:317-22.

Wetzig T, Kendler M, Maschke J, Paasch U, Simon JC. No clinical benefit of preoperative fluorescence diagnosis of basal cell carcinoma localized in the H-zone of the face. *Br J Dermatol.* 2010;162:1370–6.

Wheeland RG. Clinical uses of lasers in dermatology. *Laser Surg Med.* 1995;16:2-23.

Wollina U, Schmidt WD, Koch A, Scheibe A, Erfurth F, Fassler D. Fluorescence remission spectroscopy of psoriatic lesions and the effect of topical anthralin therapy. *JEADV.* 2009;23:1409–13.

Wood RW. Secret communications concerning light rays. *J Physiol.* 1919;5e series:t IX.

Yevdokimova NY, Podpryatov SE. Hyaluronic acid production and CD44 expression in cultured dermal fibroblasts of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus with and without chronic ulcers on the lower extremity. *Wound Repair Regen.* 2005;13:181-8.

Zellweger M, Goujon D, Conde R, Forrer M, van den Bergh H, Wagnières G. Absolute autofluorescence spectra of human healthy, metaplastic, and early cancerous bronchial tissue *in vivo*. *Applied Optics.* 2001;22:3784-91.

Zonios G, Bykowski J, Kollias N. Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed *in vivo* using diffuse reflectance spectroscopy. *J Invest Dermatol.* 2001;117:1452-7.