

SAULO NANI LEITE

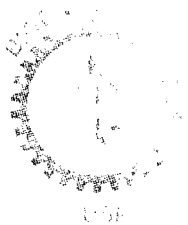
**“Fototerapia como estímulo à cicatrização de
úlceras cutâneas em ratos nutridos e
desnutridos.”**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

São Carlos
2009



SAULO NANI LEITE
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS -
GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 19/06/09.

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI
FRADE (ORIENTADOR)

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e
Assistência do Hospital das Clínicas -
FAEPA

Julgamento: APROVADO

Assinatura: Marco Andrey Cipriani Fraide

PROF. DR. NIVALDO ANTONIO
PARIZOTTO

Universidade Federal de São Carlos -
UFSCar

Julgamento: APROVADO

Assinatura: Nivaldo Antonio Parizotto

PROFA. DRA. MARIA BEATRIZ PUZZI

Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP

Julgamento: APROVADO

Assinatura: Maria Beatriz Puzzi

<i>TNF-α</i>	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Fator de Necrose Tumoral- α)
USP	Universidade de São Paulo
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Vásculo-Endotelial)
<i>WHF</i>	<i>Wound Healing Foundation</i>
<i>WHS</i>	<i>Wound Healing Society</i>

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	20
1 – Morfofisiologia da Pele	21
1.1 – Epiderme	22
1.2 – Derme	22
1.3 – Hipoderme	23
2 – Úlceras agudas e crônicas	23
3 – O processo de cicatrização	24
3.1 – Lesão	25
3.2 – Coagulação	25
3.3 – Inflamação	26
3.4 – Formação Tecidual	28
3.5 – Remodelagem Tecidual	32
4 – Desnutrição	33
4.1 – Proteínas	34
4.2 – Desnutrição protéico-energética	34
4.3 – Desnutrição e cicatrização de úlceras	35
5 – Laserterapia de baixa potência	37
5.1 – <i>Laser e LED</i>	38
5.2 – Mecanismos da fotobioestimulação	40
5.3 – Fototerapia na cicatrização de úlceras	42
5.3.1 – Fototerapia <i>in vitro</i>	43
5.3.2 – Fototerapia em experimentação animal	44
5.3.3 – Fototerapia em humanos	48
II – JUSTIFICATIVA	50

III – OBJETIVOS	53
IV – ANIMAIS E MÉTODOS	55
1 – Experimento 1	56
1.1 – Seleção dos animais	56
1.2 – Padronização do modelo animal nutrido e desnutrido	56
1.3 – Confirmação do estado nutricional	56
1.3.1 – Massa corporal	56
1.3.2 – Dosagem de albumina sérica	56
1.4 – Procedimento cirúrgico	57
1.5 – Aparelhos de fototerapia	57
1.6 – Padronização dos grupos	58
1.7 – Padronização do procedimento da fototerapia	59
1.8 – Captura e análise de imagens	59
1.9 – Avaliação da cicatrização das úlceras	60
1.10 – Avaliação histológica	62
1.11 – Mensuração da espessura da epiderme e derme	62
1.12 – Análise da colagênese	63
1.13 – Análise estatística	64
2 – Experimento 2	65
2.1 – Desnutrição induzida por dieta normoproteica associada à proteína de baixa qualidade (gelatina)	65
2.2 – Confirmação do estado nutricional	65
2.3 – Procedimento cirúrgico	66
2.4 – Aparelhos de fototerapia	66
2.5 – Padronização dos grupos	66

V – RESULTADOS	68
1 – Experimento 1	69
1.1 – Confirmação do marasmo	69
1.2 – Diferenças da pele quanto à nutrição	70
1.2.1 – Espessura da epiderme e derme	70
1.2.2 – Colagênese	71
1.3 – Estudo da cicatrização das úlceras	72
1.4 – Colagênese dos grupos	73
2 – Experimento 2	75
2.1 – Confirmação da desnutrição normoproteica associada à proteína de baixa qualidade (gelatina).....	75
2.2 – Diferenças da pele quanto à nutrição	76
2.2.1 – Espessura da epiderme e derme	76
2.2.2 – Colagênese	77
2.3 – Estudo da cicatrização das úlceras	78
2.4 – Colagênese dos grupos	79
VI – DISCUSSÃO	81
VII – CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A	102
ANEXOS	118
Anexo A	119
Anexo B	120
Anexo C	121

Introdução

1 - Morfofisiologia da pele

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme que não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (Figura 1). A pele é o maior órgão do corpo, atingindo 16% da massa corporal e desempenha várias funções como proteção contra toxinas e microorganismos presentes no ambiente, barreira hídrica, participação no sistema imunológico, termorregulação por meio de seus vasos, glândulas e tecido adiposo, propriedade sensorial, auto-regeneração, além da excreção de diversas substâncias (BARANOSKI; AYELLO, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; CLARK; GHOSH, 2007).

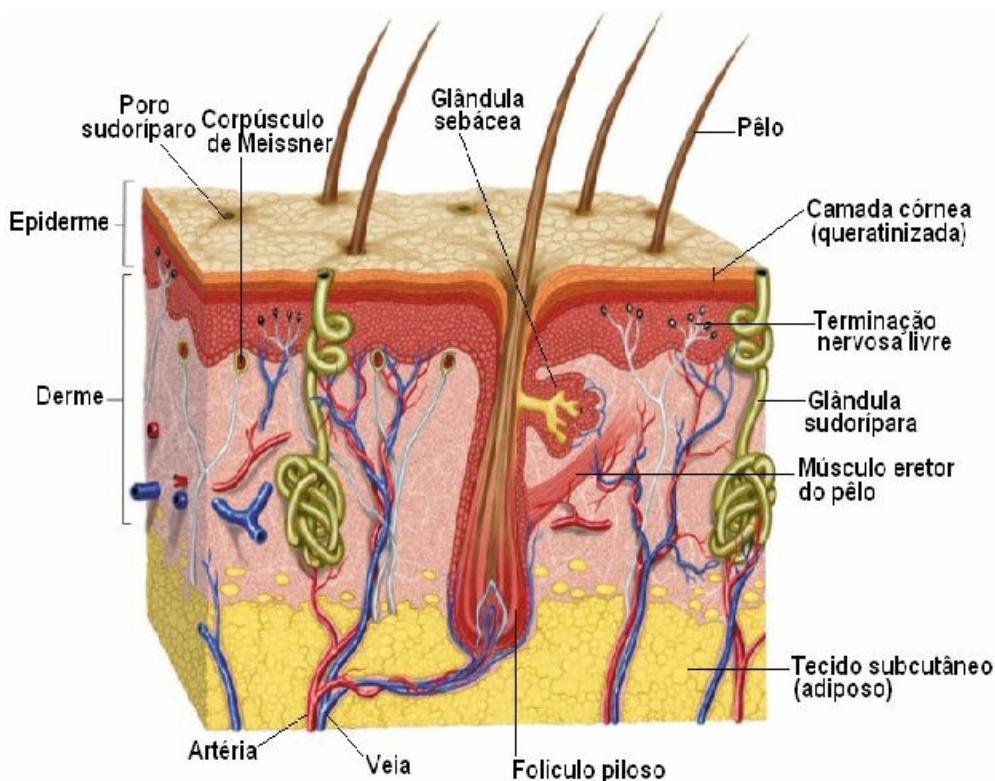


Figura 1: Esquema ilustrativo das camadas da pele e seus componentes.

1.1 - Epiderme

É a camada mais externa da pele, sendo constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Ela apresenta quatro tipos celulares característicos com suas principais funções: os melanócitos (produção de melanina), células de Langerhans (resposta imunológica), células de Merkel (mecanorreceptores), e os queratinócitos (produção de queratina) que são as células mais abundantes da epiderme.

A espessura varia de acordo com o local, sendo mais espessa na palma da mão e planta dos pés. Nessas regiões, a pele apresenta cinco camadas ou estratos da derme para superfície: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal ou germinativa consiste de uma única camada de queratinócitos sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. Ela apresenta intensa atividade mitótica sendo responsável junto com a camada espinhosa, pela constante renovação da epiderme. A camada granulosa apresenta grânulos lamelares formados por bicamada lipídica, que contribuem para formar uma barreira contra a penetração de substâncias e tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo. A camada lúcida é constituída por uma delgada camada de células achatadas e é mais evidente na pele espessa. A camada mais superficial é a córnea, de espessura variável, formada por células cujo citoplasma é repleto de queratina. A expressão de queratina pela camada de células é observada durante a diferenciação dos queratinócitos (BARANOSKI; AYELLO, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KIERSZENBAUM, 2004).

1.2 - Derme

Tecido conjuntivo onde se apóia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. É a parte mais espessa da pele, sendo composta de muitas células. Sua espessura varia de acordo com a região observada, atingindo um máximo de 3 mm na planta dos pés. Sua superfície externa é irregular observando-se saliências, as papilas dérmicas, que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. As maiores proteínas encontradas na derme são o colágeno e a elastina, ambas sintetizadas e secretadas pelos fibroblastos.

A derme é formada por duas camadas, a papilar, constituída de tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas delgadas) em íntimo contato com a epiderme, e a reticular, constituída por tecido conjuntivo denso,

contendo feixes espessos de fibras colágenas e elásticas. Além dos vasos sanguíneos, linfáticos, e dos nervos, também são encontrados na derme estruturas derivadas da epiderme como os folículos pilosos, as glândulas sudoríparas e sebáceas (BARANOSKI; AYELLO, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KIERSZENBAUM, 2004).

1.3 - Hipoderme (Tecido celular subcutâneo)

É formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. Dependendo da região do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada de espessura variável de tecido adiposo, que constitui o panículo adiposo, sendo uma reserva energética e proporciona proteção contra o frio (BARANOSKI; AYELLO, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Quando ocorre qualquer ruptura na solução de continuidade do tecido cutâneo-mucoso atingindo a camada epidérmica e pelo menos a derme papilar, alterando a estrutura anatômica e/ou fisiológica dos tecidos afetados, ocorre a formação de úlcera, podendo ser classificada como aguda ou crônica.

2 - Úlceras agudas e crônicas

A cicatrização é um processo biológico complexo onde ocorrem eventos de maneira coordenada e seqüencial envolvendo interações de vários tipos celulares, componentes da matriz, proteases e citocinas. As úlceras agudas como as cirúrgicas e traumáticas cicatrizam normalmente durante esses eventos de modo organizado e rápido. Elas geralmente cicatrizam por primeira intenção, minimizando o volume de tecido conjuntivo depositado, gerando mínima formação de cicatriz e restaurando a barreira epitelial contra infecções (BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004). Já as crônicas, geralmente se desenvolvem devido à ocorrência de falhas durante o processo de cicatrização (EAGLESTEIN; FALANGA, 1997).

A *Wound Healing Society* (WHS) desde 1991 tem por objetivo estabelecer orientações para o tratamento das úlceras e uniformidade na definição de úlcera aguda, crônica e de cicatrização de úlceras. Por isso a partir 1994, a WHS adotou a definição de úlcera crônica proposta por Lazarus et al., (1994): “Úlceras crônicas são aquelas que falham no progresso da seqüência normal, ordenada e cronológica da cicatrização ou úlceras que passam pelo processo de reparo sem restaurar

adequadamente suas estruturas anatômicas e funcionais.” Em 2003, através da WHS e *Wound Healing Fundation* (WHF) foram desenvolvidos guias de tratamento baseados em evidência, para quatro tipos de úlceras crônicas (venosas, arteriais, diabéticas e de pressão) com colaboradores de várias áreas da saúde (ROBSON; BARBUL, 2006).

Na fase inflamatória das úlceras agudas, ocorre um equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias fazendo com que o processo inflamatório seja limitado, diferente das úlceras crônicas onde há um processo inflamatório persistente. A cascata inflamatória é alterada envolvendo citocinas exógenas e fatores de crescimento que promovem um desequilíbrio degradativo na úlcera (Figura 2). Ocorre também alteração no ambiente molecular interrompendo o ciclo inflamatório normal (CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004; MENKE et al., 2007).

As úlceras crônicas como, por exemplo, as úlceras venosas, arteriais, diabéticas, e neuropáticas cicatrizam por segunda intenção de forma desordenada e com atraso no reparo, podendo vários fatores alterar o processo normal de cicatrização, como idade, infecções, desnutrição, doenças cardiovasculares resultando em hipóxia, fumo, traumas, *diabetes mellitus*, entre outras (BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006).

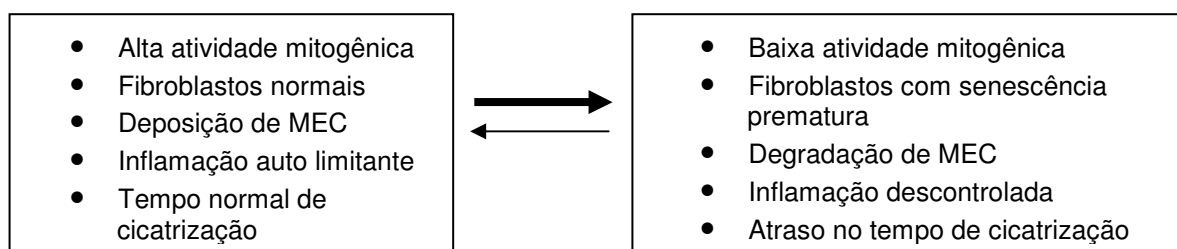


Figura 2: Desequilíbrio no processo de cicatrização entre as úlceras agudas e crônicas (MENKE et al., 2007).

3 - O processo da cicatrização

O processo de cicatrização basicamente envolve inflamação, proliferação e remodelagem teciduais. É uma complexa série de reações e interações célula-célula e célula-matriz, bem como a interação indireta entre diferentes populações celulares através de mediadores solúveis. O equilíbrio entre mediadores estimulatórios e inibitórios durante o processo de cicatrização é essencial para

alcançar a homeostasia tecidual pós lesão (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING et al., 2007).

A cicatrização de feridas envolve 5 fases seqüenciais: **lesão, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual** (CHETTIBI; FERGUSSON, 1999; BEANNES et al., 2003), embora alguns autores apresentem o processo em quatro (BARANOSKI; AYELLO, 2004) ou em apenas três fases (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING et al., 2007; LI et al., 2007; GURTNER et al., 2008).

3.1 - Lesão

O rompimento da solução de continuidade tecidual proporciona um extravasamento de sangue no local da lesão através dos vasos danificados. Aminas vasoativas como a histamina, serotonina e outros mediadores aumentam a permeabilidade vascular para permitir a transmigração de células como neutrófilos, monócitos, linfócitos, plaquetas, e proteínas plasmáticas como fibronectina e fibrinogênio, ao sítio da lesão. Esses fenômenos acontecem devido interação dinâmica de citocinas e fatores liberados pelas células, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de transformação de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β), sendo responsáveis pela síntese de matriz extracelular (CHETTIBI; FERGUSSON, 1999; BEANNES et al., 2003).

3.2 - Coagulação

A coagulação ou hemostasia ocorre logo após a lesão sendo as plaquetas e fibrina os dois principais componentes do processo. As plaquetas são as primeiras células que aparecem após a lesão e têm papel central no processo de hemostasia (LI et al., 2007).

Com a lesão vascular o extravasamento de sangue por todo o leito da lesão permite ativação das plaquetas através do contato com os componentes da matriz extracelular tais como colágeno fibrilar, fibronectina e outras proteínas adesivas da matriz. Após ativação, as plaquetas são submetidas à adesão e agregação e ao mesmo tempo liberam vários mediadores como histamina, serotonina, adenosina difosfato (ADP), tromboxano A₂ e proteínas adesivas como fibrinogênio, fibronectina, trombospodim, e fator von Willebrand (fator VIII). Esses mediadores induzem agregação plaquetária que juntamente com a conversão do

fibrinogênio em fibrina pela trombina, forma-se um coágulo de fibrina para evitar a perda de sangue (BEANNES et al., 2003; LI et al., 2007).

A agregação plaquetária ativa o fator de Hageman (fator XII) que inicia a cascata de coagulação intrínseca através de uma série de conversões de pro-enzimas em enzimas ativadas que culminam na transformação de pró-trombina em trombina. O tecido lesado libera uma lipoproteína chamada fator tecidual que ativa a cascata de coagulação extrínseca. Os monócitos e células endoteliais também expressam esse fator tecidual em sua superfície contribuindo no processo de coagulação (BARANOSKI; AYELLO, 2004; LI et al., 2007).

Além de sua participação crucial na hemostasia, as plaquetas também contribuem significativamente com outros processos na cicatrização, incluindo inflamação, reepitelização, fibroplasia e angiogênese. O coágulo de fibrina atua como matriz provisória para migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, servindo também como reservatório de fatores de crescimento tais como PDGF, TGF- α e TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), β tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF-4) e fator de angiogênese derivado de plaquetas (PDAF) (STADELMMAN et al, 1998). Elas também participam do infiltrado leucocitário através da liberação de fatores quimiotáticos derivados das plaquetas (LI et al., 2007).

3.3 - Inflamação

A fase inflamatória é caracterizada por um influxo de leucócitos para a área da lesão. Dentro de poucas horas pós lesão, grande quantidade de neutrófilos atravessam o endotélio dos capilares sanguíneos, ativados por citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α), e interferon γ (IFN- γ) para a área lesionada, levando a expressão de moléculas de adesão e rolamento dos leucócitos. As moléculas de adesão presentes na superfície das células endoteliais como as P-selectinas e E-selectinas, assim como ICAM-1 e ICAM-2, são cruciais no processo de rolamento (EMING et al., 2007). Essas moléculas interagem com as integrinas presentes na superfície dos neutrófilos incluindo CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95), CD11d/CD18. Quimiocinas e seus receptores incluindo interleucina 8 (IL-8), oncogene α relacionada com o crescimento, e proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1), também são essenciais para o recrutamento dos neutrófilos,

assim como os produtos bacterianos e lipopolissacarídeos que acumulam na lesão infectada podendo acelerar o recrutamento de neutrófilos para a lesão (SHERWOOD et al., 2004; ESCHE et al., 2005).

Os neutrófilos recrutados iniciam o desbridamento do tecido lesionado e fagocitose de agentes infecciosos liberando várias substâncias antimicrobianas (espécie reativa derivada do oxigênio (*ROS*), peptídeos catiônicos, eicosanóides) e proteinases (elastases, catepsina G, proteinase 3). Os neutrófilos têm meia vida curta, mas havendo processo infeccioso na lesão a presença dos neutrófilos pode prolongar podendo comprometer a cicatrização (EMING et al., 2007).

Os monócitos são inicialmente atraídos para a área da lesão por sinais liberados por quimiocinas específicas como MCP-1 e proteína 1 de macrófagos inflamatórios. Os produtos de degradação da matriz extracelular, fragmentos de colágeno, de fibronectina, e trombina são quimioatraentes específicos para monócitos. Na área da lesão, os monócitos se diferenciam em macrófagos geralmente em torno de 48 a 96 horas pós trauma. Os macrófagos são considerados a célula regulatória mais importante da reação inflamatória, com papel importante em todas as fases da cicatrização (Figura 3). Eles fagocitam, digerem, e destroem organismos patógenos, removem *debris* celulares e neutrófilos remanescentes. Esses processos importantes realizados por monócitos/macrófagos permitem induzir a angiogênese e formação do tecido de granulação (LEWIS et al., 1999).

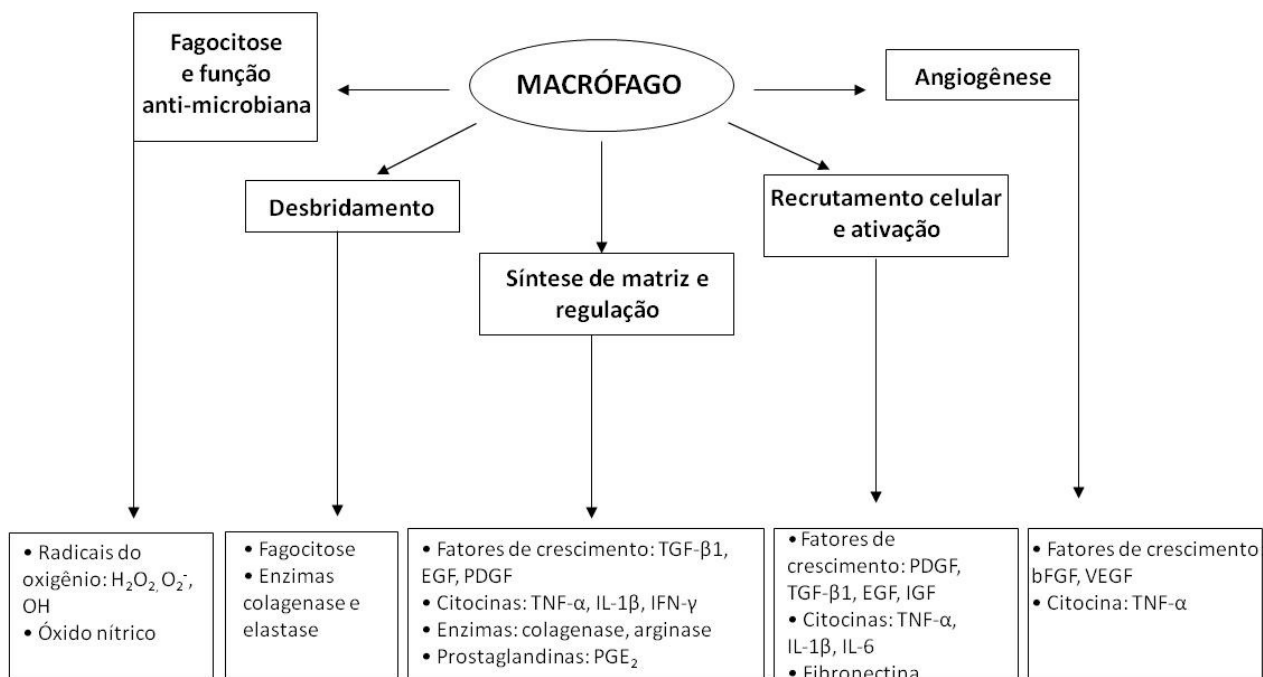


Figura 3: Importantes funções dos macrófagos em todas as fases do processo de cicatrização (WITTE, BARBUL, 1997).

Os macrófagos liberam fatores quimiotáticos (por exemplo, fibronectina) que atraem fibroblastos para a lesão. O crescimento de novos vasos sanguíneos segue um gradiente de fatores angiogênicos produzidos por macrófagos em hipóxia, pois macrófagos não produzem esses fatores angiogênicos quando estão totalmente oxigenados ou em anóxia. Os macrófagos também são considerados reservatórios de fatores de crescimento incluindo PDGF, TGF- α , TGF- β , FGF, fator de crescimento vâsculo-endotelial (VEGF), que promovem migração, proliferação celular e síntese de matriz extracelular (FALANGA, 1999). Os macrófagos ativados são importantes na transição para a fase proliferativa da cicatrização (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING et al., 2007; LI et al., 2007).

3.4 - Formação tecidual

A resposta inflamatória inicial à lesão promove uma estrutura necessária para a produção de uma nova barreira funcional. Essa fase, também chamada de proliferativa, se inicia geralmente três dias pós lesão e é marcada por uma intensa atividade celular e migração de diferentes tipos celulares para a região lesada. Os maiores eventos dessa fase são a formação do “tecido de granulação”, devido a aparência granular gerada pelos capilares neoformados, e a reepitelização. Essa granulação é formada por dois mecanismos, a formação de novos vasos

(angiogênese), proliferação e migração dos fibroblastos para a lesão (fibroplasia) (KARUKONDA et al., 2000; LI et al., 2007)

A granulação tecidual forma-se mediante ação de fatores de crescimento específicos que são secretados por células parenquimatosas lesadas e por monócitos e macrófagos. Os macrófagos, os fibroblastos e os vasos sanguíneos são importantes agentes que atuam de maneira interdependente no interior da lesão durante este processo. Os macrófagos por serem uma fonte contínua de fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia e a angiogênese, os fibroblastos por atuarem na construção da nova matriz extracelular que dará suporte para a chegada de células de reparo e os vasos sanguíneos neoformados por transportarem oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular que nesta fase é intenso. Assim, o processo de granulação tecidual ocorre como consequência dos mecanismos de fibroplasia e angiogênese (KARUKONDA et al., 2000).

A fibroplasia traduz-se pela proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da lesão por estímulo de fatores de crescimento como PDGF, fator básico de crescimento de fibroblasto (b FGF), EGF e TGF- β . A expressão do PDGF pelos fibroblastos é amplificada pela sinalização autócrina e parácrina (BROUGHTON; JANIS, 2006). Os fibroblastos que já estão na área lesionada, começam a sintetizar colágeno e se diferenciarem em miofibroblastos (induzidos pelo TGF- α secretado pelos macrófagos), para a contração da lesão (BROUGHTON; JANIS, 2006; LI et al 2007). Essa contração cicatricial mediada pelos miofibroblastos é estimulada por 5-hidroxitriptofano, prostaglandina $F_{1\alpha}$, angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina ou norepinefrina e, também, por participação do TGF- β (KARUKONDA et al., 2000).

À semelhança das células epiteliais, os fibroblastos migram para a lesão valendo-se de alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana celular ao acaso, chamados lamelopódios, que são análogos dos pseudópodos das células epiteliais em migração (GIANCOTTI et al., 1990; CHAN et al., 1992). Uma vez no interior da lesão, os fibroblastos interagem com os elementos da MEC (matriz extracelular) sintetizando, depositando e remodelando-a. Os fibroblastos assumem uma nova função que é a de sintetizar proteínas (STADELMANN et al., 1998; BROUGHTON; JANIS, 2006). Gradualmente estas células mudam seu fenótipo migratório para um fenótipo profibrótico, que começa

pela dispersão do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi pelo citoplasma até apresentarem abundante retículo endoplasmático rugoso e Golgi repleto de novas proteínas representadas pelos colágenos. A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF- β .

O colágeno é o principal alicerce do tecido conectivo e é formado por uma hélice tripla de cadeias de polipeptídeos α , com uma seqüência de repetição de gly-x-y. A combinação das 3 cadeias formam uma unidade básica de colágeno chamada tropocolágeno. Os filamentos de colágeno são feitos de subunidades de tropocolágeno, que por sua vez se combinam para formar as fibrilas colágenas que se agregam para formar as fibras de colágeno (Figura 4) (STADELMANN et al., 1998; KUMAR et al., 2005).

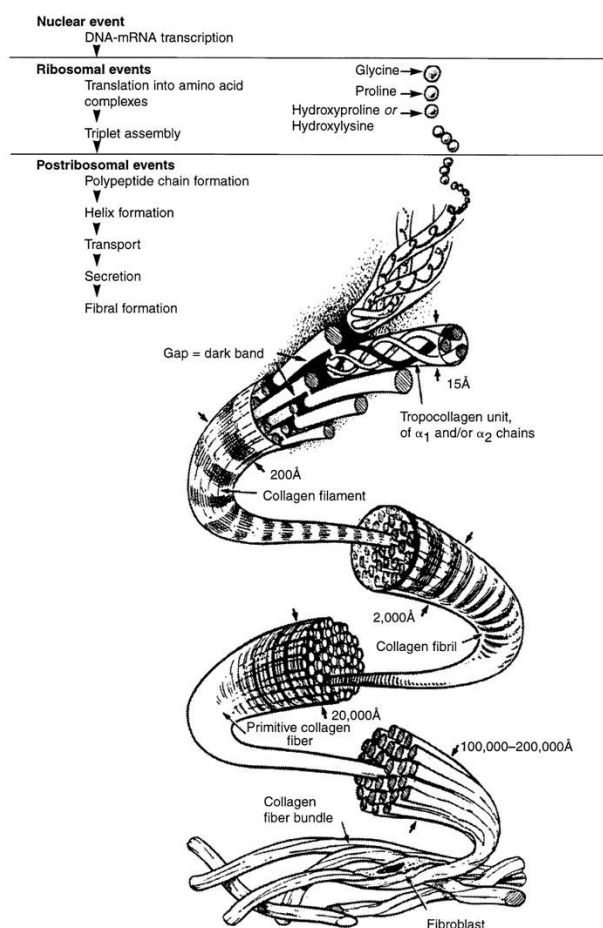


Figura 4: Estrutura molecular e fibrilar do colágeno. Notar no canto superior esquerdo um esquema da síntese do colágeno. Notar que a fibra colágena é formada por fibra colágena primitiva que é formada por fibras colágenas que são formadas por filamentos colágenos que são formados por tropocolágenos que são formados por 3 cadeias com seqüências repetidas de gly-x-y. Cada uma das 3 cadeias são enroladas entre si e também entre as 3 juntas. Toda esta disposição permite ser o colágeno um conector de tecidos e também assegura a força tênsil das feridas, da pele e de órgãos (STADELMANN et al., 1998).

A angiogênese é um processo de grande importância na formação do tecido de granulação. Ela se refere ao crescimento de novos vasos a partir do brotamento de vasos pré existentes adjacentes à área lesada envolvendo uma série de mecanismos complexos dependentes da MEC local, bem como de alterações fenotípicas e fatores mitogênicos estimuladores de células endoteliais, que são elementos protagonistas deste processo (ARNOLD; WEST, 1991). O aumento da atividade celular durante o processo cicatricial causa aumento do metabolismo e uma demanda maior de nutrientes. A deficiência desses nutrientes pode impedir ou dificultar a cicatrização (MACKAY; MILLER, 2003; BROUGHTON; JANIS, 2006).

A célula endotelial é a principal da angiogênese e surge de vasos e capilares lesados. Elas saem desses vasos, degradam e invadem a matriz provisória da lesão formando um “broto”. Esses brotos se estendem e conectam a outro capilar para formar uma rede vascular permitindo a circulação do sangue (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogênese como FGF (α e β), EGF, TGF- α , PDGF, TGF- β , VEGF, fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF) e peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991).

A reepitelização é o processo de restauração da epiderme após a lesão, envolvendo vários processos incluindo a migração e proliferação de queratinócitos da epiderme adjacente para a área da lesão, a diferenciação do novo epitélio em epiderme estratificada, e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme com a derme subjacente (LI et al., 2007).

A migração dos queratinócitos é iniciada a partir de uma resposta à lesão epidérmica, migrando das bordas para o centro da lesão. Vários elementos estão ligados à migração dos queratinócitos como a matriz extracelular, receptores de integrina, metaloproteinases da matriz (MMP's), e citocinas inflamatórias. IL-1 β e TNF- α regulam o gene de expressão do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) em fibroblastos que por outro lado sintetizam e secretam KGF-1, KGF-2 e IL-6 que estimulam os queratinócitos vizinhos para migrarem para a lesão, proliferarem e se diferenciarem para formar a epiderme (BROUGHTON; JANIS, 2006; WERNER et al., 2007). Os queratinócitos utilizam seus receptores de integrina para interagir com a matriz provisional rica em fibronectina, fibrina e colágeno tipo V. Esses receptores interagem com as moléculas de colágeno neoformado na lesão regulando a direção da migração dos queratinócitos. Os queratinócitos que estão migrando, produzem

MMP's como a MMP-9 que especificamente degrada colágeno tipo IV e lamininas na membrana basal permitindo que células saiam da membrana e migrem para a lesão. Quando a migração cessa, os queratinócitos entram no substrato adjacente, reconstituem a membrana basal e retomam o processo terminal de diferenciação para gerar a epiderme estratificada. A formação de uma membrana basal derme-epiderme é essencial para o restabelecimento da integridade e função da pele. A membrana basal é formada por muitas proteínas da matriz extracelular, sendo o colágeno e as lamininas os seus principais componentes. O colágeno IV é o mais abundante formando uma lâmina densa na membrana basal, e o colágeno VII também chamado de fibrilas de ancoragem, forma na derme papilar superior uma estrutura chamada placa de ancoragem. Já as lamininas são os maiores componentes não colagênicos da matriz extracelular de uma ampla variedade de membranas basais presentes nos tecidos humanos. As lamininas 5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$) e as lamininas 10 ($\alpha_5\beta_5\gamma_1$) são as maiores presentes na membrana basal da junção derme-epiderme e parecem participar ativamente da reparação tecidual (UITTO et al., 1997; PARKS, 1999; LI et al., 2007).

3.5 - Remodelagem tecidual

Na fase de remodelagem tecidual há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. Ocorre um equilíbrio entre formação de colágeno novo e degradação de colágeno velho através da ação das colagenases (KARUKONDA et al., 2000). Esse processo é também caracterizado pela redução gradual da celularidade e vascularidade (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. Ocorre uma remodelagem da matriz extracelular pelas metaloproteinases que incluem colagenases intersticiais, colagenase tipo IV e gelatinases. As principais citocinas envolvidas nesta fase são TNF- α , IL-1 β , PDGF, TGF- β produzidas pelos fibroblastos além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e TGF- β (KARUKONDA et al., 2000). Condições patológicas como o diabetes, aterosclerose, hipertensão, desnutrição protéico-energética dentre outras, podem causar problemas na deposição de matriz e colágeno comprometendo a força tênsil da lesão. Por outro lado, se houver excessiva síntese de colágeno, pode resultar em cicatriz hipertrófica ou quelóide (BROUGHTON; JANIS, 2006).

Na derme de indivíduos saudáveis, o colágeno tipo I é mais abundante que o colágeno tipo III, porém durante as fases precoces da cicatrização de feridas, ocorre um predomínio do colágeno III sintetizado pelos fibroblastos no tecido de granulação. Após período de um ano ou mais, a derme gradualmente retorna ao fenótipo pré-lesão estável, ocorrendo uma predominância do colágeno tipo I (LI et al., 2007). O colágeno da cicatriz, mesmo após um ano de maturação, não será tão organizado quanto o colágeno encontrado na pele não lesada. A força tênsil (uma avaliação funcional do colágeno) da lesão alcança um nível máximo de 70% a 80% da força pré-lesão (STADELMANN et al., 1998; BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; LI et al., 2007).

A complexidade do processo de cicatrização de úlceras a torna vulnerável a diversos fatores que podem influenciar as fases do processo cicatricial, afetando as respostas fisiológicas e funções celulares. Tais fatores podem ser locais como as infecções, fatores mecânicos (compressão de vasos), presença de corpos estranhos (fragmentos de aço ou vidro), e as características da lesão (tamanho, local, tipo), ou sistêmicos como a condição metabólica (*diabetes mellitus*), condição circulatória (aterosclerose), hormônios e **nutrição (desnutrição protéico-energética)** (POTTER; PERRY, 2000; MACKAY, MILLER, 2003; BROUGHTON; JANIS, 2006;).

4 - Desnutrição

A desnutrição é descrita como um estado de deficiência de energia, proteína ou outro nutriente específico, que acarreta uma alteração na função corporal e associado à piora das doenças, podendo ser revertida com suporte nutricional adequado (ALLISON, 2000). A desnutrição é altamente prevalente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e geralmente está associada a problemas sócio-econômicos, educacionais, de saúde e saneamento básico. Houve uma estimativa que, entre 2000 e 2002, 852 milhões de pessoas no mundo estavam desnutridas, sendo que a maioria (815 milhões) viviam em países em desenvolvimento (MULLER; KRAWINKEL, 2005). Os casos extremos de desequilíbrio nutricional, como a fome e a desnutrição, induzem no indivíduo uma série de alterações bioquímicas e orgânicas, como distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos, e assim, um quadro de desnutrição, tanto a partir de uma privação de dieta ou induzida por situações de estresse, que alteram os

requerimentos protéicos dos indivíduos e as suas necessidades na composição de aminoácidos (FAO/WHO/UNU, 1985).

4.1 - Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais importantes do organismo, pois além das funções estruturais, agem como catalisadores biológicos, hormônios, participam da função imunológica, regulam o desenvolvimento celular e participam ainda do transporte de substâncias (MAHAN; ARLIN, 1998). O uso das proteínas alimentares requer que todos os aminoácidos essenciais sejam fornecidos na dieta em quantidades adequadas para satisfazer os requerimentos necessários ao perfeito desempenho de suas funções fisiológicas. Elas apresentam uma ação cooperada com cofatores orgânicos e inorgânicos representados pelas vitaminas e sais minerais, cuja falta ou deficiência compromete a função enzimática (DE ANGELIS, 1995). Quando as proteínas deixam de exercer seu papel estrutural e enzimático, instala-se um estado de desequilíbrio metabólico, podendo gerar no indivíduo quadros anêmicos, hipovitaminoses e **desnutrição protéico-energética**, sendo essa última um dos principais problemas sociais brasileiros (NUNES; BATISTA; MICHELI, 2002).

4.2 - Desnutrição protéico-energética

A desnutrição protéico-energética (DPE) resulta da ingestão alimentar inadequada e é caracterizada por déficits de energia, devido à redução na ingestão de todos os macronutrientes e micronutrientes (ILSI, 2008). Na DPE ocorrem mudanças patológicas, incluindo deficiência imunológica devido à deficiência protéica e a perda de mediadores imunológicos, como por exemplo, o TNF. Distúrbios metabólicos provocam aumento na degradação intercelular dos ácidos graxos pela deficiência de carboidratos (MULLER, KRAWINKEL, 2005). A DPE pode ser primária, resultante da ingestão inadequada de calorias e/ou de proteínas sendo comum nos países em desenvolvimento, ou secundária, decorrente de uma patologia de base. Esse estado patológico pode causar diminuição da ingestão calórica ou protéica (anorexia, disfagia, obstrução gastrointestinal), aumento da perda de nutrientes (má absorção ou diarreia), aumento da demanda de nutrientes (lesão ou infecção) (KWIATKOWSKY et al., 2000).

Clinicamente a DPE se apresenta sob duas formas extremas, o Marasmo e o Kwashiorkor, porém entre elas há um amplo espectro de manifestações anômalas de crescimento e desenvolvimento, sendo que ambas as formas apresentam quadros clínicos e metabólicos bem distintos. O marasmo é caracterizado frequentemente como um exemplo de adaptação metabólica a um déficit nutricional, enquanto o Kwashiorkor representaria ausência de adaptação. Muitas vezes os sinais e sintomas se superpõem, produzindo uma combinação dos dois, chamado marasmo-Kwashiorkor (LIMA, 2003).

O marasmo é a forma predominante da DEP na maioria dos países em desenvolvimento podendo afetar todas as faixas etárias. Ocorre quando a ingestão de nutrientes é insuficiente para suprir a demanda orgânica e então o corpo utiliza seus próprios estoques de energia primeiramente convertendo glicogênio hepático em glicose (gliconeogênese), em seguida os estoques de gordura mobilizados na forma de ácidos graxos livres (cetogênese), e por fim a utilização das proteínas dos músculos esqueléticos (KWIATKOVSKY et al., 2000; ILSI, 2008). Conseqüentemente, o indivíduo apresenta diminuição crônica de peso pela perda de massa muscular e gordura corporal, assim como déficit de crescimento, perda do tecido adiposo subcutâneo, atrofia muscular e estado mental em “alerta”. Os níveis das proteínas viscerais (albumina sérica, pré-albumina e transferrina) se mantêm praticamente inalterados, tendo sua queda tardiamente (KWIATKOVSKY et al., 2000; BARANOSKI, AYELLO, 2004; MECHANICK, 2004; MULLER, KRAWINKEL, 2005). No Kwashiorkor geralmente ocorre uma deficiência protéica que é mais marcante que a deficiência energética, resultando em uma diminuição da síntese protéica e edema. Pode ocorrer também pelo aumento da demanda de nutrientes em quadros catabólicos agudos, como a sepse e queimaduras. Geralmente o indivíduo apresenta quadros de anemia, hepatomegalia, letargia, proteínas viscerais diminuídas, disfunção imunológica grave, e morte precoce (KWIATKOVSKY et al., 2000; MECHANICK, 2004; MULLER, KRAWINKEL, 2005; ILSI, 2008).

4.3 - Desnutrição e cicatrização de úlceras

A DEP atinge a pele ocasionando alterações morfofuncionais significativas, predispondo-a a perda de sua integridade (úlceras) e difícil cicatrização. A desnutrição altera a reação inflamatória, a função imune e a regeneração tecidual causando aumento das citocinas pró-inflamatórias, atraso na cicatrização e maior

risco de infecções (BARANOSKI, AYELLO, 2004; MECHANICK, 2004; PINHEIRO et al., 2006). Portanto, para manter a estrutura da pele e suas funções, são necessários níveis adequados de nutrientes como proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais (THOMAS, 2001; RUSSELL, 2001, COELHO, SILVA, 2004; MECHANICK, 2004).

O processo cicatricial das úlceras precisa de um ambiente fisiológico adequado para o processo de reparação tecidual, porém deficiências que ocorram em qualquer nutriente do organismo podem resultar em piora ou atraso na cicatrização. A falta de vitamina C, por exemplo, prejudica a síntese de colágeno; já a deficiência de proteínas provoca prolongamento do processo inflamatório, inibe a fibroplasia, prejudica a síntese de colágeno e proteoglicanos e aumenta o risco de deiscências (RUSSELL, 2001; MACKAY, MILLER, 2003; BROUGHTON, JANIS, 2006).

A deficiência protéica e de alguns aminoácidos como a arginina e a metionina, parece comprometer a cicatrização, prolongando a inflamação, interrompendo a deposição de matriz, e comprometendo a proliferação celular e angiogênese. A arginina está envolvida na síntese de colágeno, sendo que após a lesão, ocorre uma diminuição nos estoques corporais (PATEL, 2005; BROUGHTON, JANIS, 2006). O colágeno é a maior proteína estrutural dos seres humanos, sendo um terço da proteína corporal e três quartos das proteínas presentes na pele. Ele está intimamente ligado à força tênsil e flexibilidade da pele, sendo importante no processo de cicatrização. Porém, durante o processo de desnutrição, sua deposição diminui, comprometendo suas funções durante o reparo (PATEL, 2005).

Outro problema acarretado pela deficiência de proteínas é o surgimento de edema que é secundário à diminuição da albumina sérica (hipoalbuminemia), que é responsável pela manutenção da pressão colóido-osmótica nos tecidos. Além disso, a albumina serve como carregador de proteínas transferindo fatores necessários para cicatrização como aminoácidos, zinco e ácidos graxos. Ela também é uma fonte de aminoácidos para o processo de cicatrização, e as células podem adquirir albumina de compartimentos intra ou extravasculares, pois ela é altamente permeável às membranas celulares (RUSSELL, 2001; KOBAYASHI et al., 2004) Baixos níveis de albumina (abaixo de 3 g/100ml) estão associados a uma pobre cicatrização das úlceras (POTTER, PERRY, 2000; BARANOSKI, AYELLO, 2004). Pacientes que apresentam úlceras e estão com o estado nutricional debilitado

devem ser submetidos à rápida reposição nutricional para evitar infecções, internações hospitalares ou o seu prolongamento, e o risco de mortalidade (THOMAS, 2001; RUSSELL, 2001; MACKAY, MILLER, 2003; BARANOSKI, AYELLO, 2004, COELHO, SILVA, 2004; MECHANICK, 2004; PATEL, 2005).

Atualmente, aumentaram as alternativas terapêuticas no mercado para a cicatrização de úlceras. A fototerapia (*laser* de baixa intensidade e *LED's*) vem sendo utilizada através dos anos, na tentativa de melhorar e acelerar o processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em modelos experimentais e estudos clínicos em humanos. Apesar da grande quantidade de trabalhos relacionados sobre o assunto, a fototerapia ainda é muito controversa e seus mecanismos pouco elucidados.

5 - Laserterapia de baixa potência

Os primeiros trabalhos sobre laserterapia de baixa potência ou baixa intensidade (então chamada de “bioestimulação com *laser*”) apareceram há mais de trinta anos. Nas décadas de 60 e 70, doutores da Europa Oriental, principalmente soviéticos e húngaros, desenvolveram ativamente a bioestimulação com *laser*. Os primeiros relatos de aplicações clínicas da bioestimulação com *laser* foram apresentados pelo húngaro Endre Mester, em 1966, que utilizou *lasers* de rubi na cicatrização de úlceras crônicas de membros inferiores. Contudo, o *laser* de hélio-neônio (HeNe) foi o primeiro aparelho de luz coerente comercialmente viável, sendo amplamente utilizado por vários pesquisadores, em estudos experimentais e em humanos. Acreditava-se que os efeitos bioestimulatórios observados pelo *laser* HeNe (a luz vermelha em particular) eram atribuídos a uma única propriedade: a alta coerência (unidirecionalidade) dessa irradiação (KARU, 1989). A partir daí, cientistas do mundo todo começaram a pesquisar e debater sobre a credibilidade dos estudos da ação do *laser* visível de baixa potência no organismo a nível molecular. Vários pontos da bioestimulação com *laser* que eram de grande interesse na época, começaram a ser analisados e elucidados em revisões que apareceram nos anos 80 (MESTER et al., 1985; LOBKO et al., 1985; KARU, 1987; KARU, 1989). Esses trabalhos começaram a mostrar que os efeitos no tecido até então atribuídos ao fenômeno da bioestimulação com *laser*, eram na verdade a interação da luz (não coerente) com o material biológico. Sendo assim, a irradiação com a luz visível monocromática na região do azul, vermelho e ao infravermelho próximo, pode

umentar o processo de metabolismo nas células (KARU, 1987; KARU, 1988, KARU, 1989). Quando a luz atinge o tecido, ela pode ser refletida, espalhada ou absorvida, sendo que somente a luz absorvida vai interagir com o tecido sendo que a quantidade de luz absorvida e espalhada nos tecidos superficiais afeta a profundidade da radiação. Portanto a interação da fotoestimulação com o tecido depende do comprimento de onda (monocromaticidade), largura do pulso, densidade de potência (intensidade) e dose (fluência ou densidade de energia) da luz (COTTON, 2004).

Desde então, tratamentos com aparelhos de luz coerente (*laser*) e não coerente (*LED's – Light Emission Diode* ou *SLD's – Superluminescent Light Diode*) vêm sendo amplamente utilizado em experimentação e ensaios clínicos, utilizando vários protocolos diferentes de dose, intensidade e comprimento de onda. Atualmente a terapia com *laser* de baixa potência ou fotobioestimulação é considerada parte da fototerapia, bem como parte da fisioterapia. A fototerapia é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos e atualmente o uso dos *lasers* e *LED's* representam o avanço do desenvolvimento tecnológico da fototerapia (KARU, 2003).

5.1 - Laser e LED

A palavra *LASER* é o acrônimo do inglês de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação. É uma forma de energia eletromagnética luminosa, visível ou não, que se caracteriza por sua frequência, amplitude e comprimento de onda (COSTA, 2002). Essas emissões de luz estão organizadas segundo o que se chama de “espectro de radiações eletromagnéticas”. Esse espectro é composto entre outras, de radiações vermelhas, infravermelhas e ultravioletas, e o que diferencia o tipo de radiação emitida são os comprimentos de onda, ou seja, para identificar em que parte do espectro está uma determinada radiação é necessário saber o comprimento de onda dessa radiação (ALMEIDA-LOPES; LOPES, 2005).

Resumidamente, o aparelho *laser* consiste em uma cavidade, onde existirá um meio ativo podendo ser composto de substâncias gasosas, líquidas, ou sólidas, que quando seus átomos ou moléculas são excitados por uma fonte de energia externa, gerarão luz *laser*. Essa energia é absorvida pelos elétrons da camada de valência do meio ativo, que saltam para um nível de energia mais

elevado, portanto com nível de energia mais alto. Como os átomos não conseguem manter esse estado de excitação por um longo período, os elétrons voltam para suas órbitas iniciais, liberando uma forma de energia altamente concentrada que se chama fóton. Esse fóton estimula outros átomos que já estavam no estado excitado (emissão estimulada), desencadeando um processo em cascata, resultando na geração do feixe *laser* (BAGNATO, 2001; COSTA, 2002).

Essa cavidade do *laser* apresenta um ressonador que é composto por espelhos colocados nas paredes da cavidade de forma paralela, sendo que um dos espelhos reflete parcialmente a luz. Portanto, os fótons emitidos podem ser refletidos nessa cavidade estimulando outros átomos do meio ativo que também emitirão outros fótons, até atingir um estágio final de amplificação da radiação. O espelho que reflete parcialmente permite que um feixe de luz seja emitido, dando o comprimento de onda específico (monocromaticidade) (COTTON, 2004).

A luz *laser* tem características que a diferencia da luz de outras fontes luminosas, como a monocromaticidade, por ser composta de fótons de um comprimento de onda específico, sendo que a radiação emitida tem uma frequência única que determina a cor da luz se ela estiver no espectro visível. Porém, a radiação também pode estar na faixa do infravermelho ou ultravioleta, dependendo das características do material utilizado na sua fabricação. Outra propriedade da luz *laser* é a coerência, ou seja, todos os fótons seguem em uma única direção, movendo-se em fases no tempo e no espaço, sendo altamente ordenada e organizada. Finalmente, a luz *laser* possui colimação, ela é unidirecional, paralela ao seu eixo de geração e com convergência angular muito pequena, devido aos feixes de fótons serem colimados (polarizados, paralelos) (COSTA, 2002).

A sigla *LED* significa *Light Emission Diode*, ou seja, Diodo Emissor de Luz, originalmente produzidos pela *NASA* para experimentos espaciais, oferecendo uma terapia alternativa aos *lasers*. Os mecanismos de ação dos *LED's* no tecido são similares aos dos *lasers*, porém existem algumas propriedades diferentes. Os *LED's* são diodos semicondutores que emitem luz não coerente, atômico e produzidos com comprimentos de onda variados. Os aparelhos com *LED's* diferem do *laser* por permitirem ser construído com agrupamento de *LED's* (*cluster*) com um ou mais comprimento de onda, e assim, em vários tamanhos de sondas. A fototerapia por *LED* é bem tolerado pelos tecidos biológicos, sem efeitos colaterais, aprovada pelo

Food and Drug Administration (FDA) (WHELAN et al., 2001; WONG-RILEY et al., 2005; SOBANKO; ALSTER, 2008).

5.2 - Mecanismos da fotobioestimulação

Os mecanismos da estimulação da fototerapia (*laser* e *LED's*) nos tecidos são complexos e ainda não estão totalmente elucidados. Tiina Karu em 1988 foi a primeira a relatar os mecanismos de interação do *laser* com o tecido, a nível molecular. Ela sugeriu que componentes da cadeia respiratória das mitocôndrias funcionavam como fotorreceptores primários da estimulação. A irradiação de luz transmitida via energia dos fótons para a célula é transformada em energia bioquímica, que será utilizada na cadeia respiratória mitocondrial. Em 1999, Karu discutiu que o citocromo c oxidase (complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) poderia ser o fotorreceptor primário da fotoestimulação e que esse mecanismo de ação difere entre os comprimentos de onda que se situam na região do visível e do infravermelho (IV) próximo (630-1000 nm). Nessa região, a fotobioestimulação ou fotobiomodulação, ativa a cadeia respiratória por meio da absorção da luz no citocromo c oxidase, aumentando a transferência de elétrons e metabolismo oxidativo da mitocôndria, o que aumenta a geração de espécies de oxigênio reativo, funcionando como moléculas sinalizadoras para promover a comunicação entre mitocôndria, citosol e núcleos. As reações primárias das moléculas fotorreceptoras levam às respostas fotobiológicas a nível celular através de cascatas das reações homeostáticas e bioquímicas, como a ativação dos genes de fatores de transcrição, gene de expressão de subunidade de citocromo oxidase, assim como outras enzimas e vias relacionadas com aumento do metabolismo oxidativo. Portanto, as células absorvem os fótons e os transforma em adenosina trifosfato (ATP), que será utilizado nos processos metabólicos, síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas, enzimas, e outros produtos necessários para o reparo ou regeneração dos componentes celulares, acelerar mitoses ou proliferação celular e restaurar a homeostasia (KARU, 1999; WHELAN et al., 2001; WHELAN, 2003; KARU, 2003, WONG-RILEY et al., 2005; DESMET et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007).

Após as reações primárias ocorridas na mitocôndria, inicia-se uma cascata de sinalização celular (reação secundária) que parece ser regulada pelo estado redox intracelular (estado óxido-redutivo da célula). A célula é exposta a uma variedade de situações de estresse no ambiente extracelular e intracelular, havendo

contínua exposição de espécie reativa de oxigênio (*ROS*). Esses *ROS* gerados por situações de estresse e fatores de crescimento, não são somente tóxicos para a célula, mas também são mensageiros secundários da sinalização de ativação e morte celular, e o estado de redox intracelular exerce função importante na regulação das vias fisiológicas de sinalização em muitas células (MATSUZAWA; ICHIJO, 2005). Acredita-se que a modulação do estado redox ativa os mecanismos de sinalização celular, através de fatores de transcrição e fosfolipases. Como regra, oxidantes estimulam os sistemas de sinalização celular e geralmente os redutores suprimem as cascatas sinalizadoras, resultando em supressão dos fatores de transcrição (KAMATA; HIRATA, 1999). Em 1988, Karu sugeriu que a ativação do metabolismo celular por luz visível monocromática é dada através da regulação do redox celular. A irradiação é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória e as respostas biológicas dependem da dose, comprimento de onda e intensidade dessa irradiação.

A Figura 5 mostra a magnitude dos efeitos da fototerapia como dependente do estado redox inicial da célula. A principal idéia é que a resposta celular é fraca ou ausente quando o potencial redox da célula é ótimo ou próximo disso. Essa resposta celular é mais significativa quando o potencial redox da célula alvo é inicialmente deslocado para um estado mais reduzido (baixo pH intracelular) como em certas situações patológicas (diabetes, infecções ou desnutrição). Isso pode explicar porque os graus de resposta podem diferenciar entre os experimentos e porque algumas vezes essa resposta nem existe. Portanto, variações na magnitude dos efeitos da fototerapia (forte, fraco ou ausente) a nível celular são explicadas pelo estado redox (e pH intracelular) no momento da irradiação, sendo que células com o pH mais baixo (estado redox mais reduzido) respondem melhor à luz do que as células com pH normal (REDDY et al., 2001; KARU, 2003; PINHEIRO et al., 2004; ALMEIDA-LOPES; LOPES, 2006).

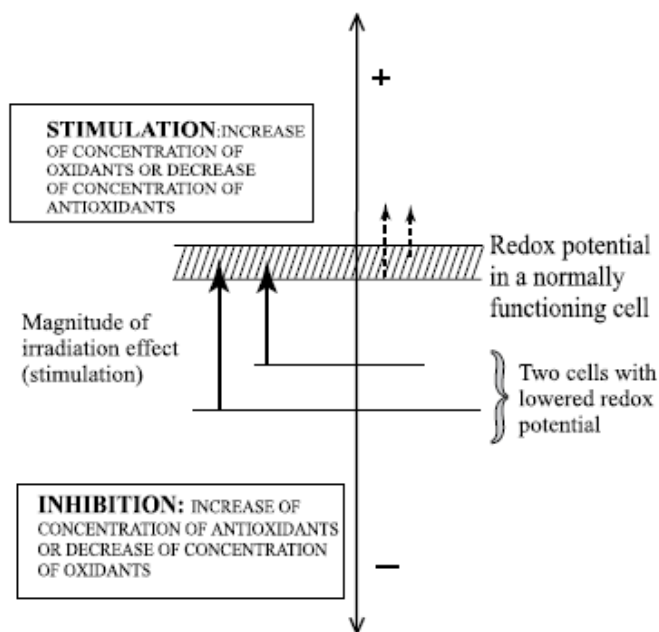


Figura 5: Esquema ilustrativo da ação principal da radiação monocromática visível e infravermelho próximo, na célula. A irradiação desloca o potencial redox celular na direção mais oxidativa. A magnitude da resposta celular é determinada pelo potencial redox celular no momento da irradiação (KARU, 2003).

Além desse mecanismo fotoquímico, que está associado à absorção em nível mitocondrial (PASSARELA et al., 1984; KARU, 1988; GRECO et al., 1989; FRIEDMANN et al., 1991; VACCA et al., 1993; MANTEIFEL, et al., 1997; KARU 1999, KARU 2003, WONG-RILEY et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007), as células também absorvem a energia dos fótons por mecanismo foto-físico ao nível da membrana celular, aumentando a troca de íons entre a célula e o citoplasma (ROZENGURT; MENDOSA, 1980; POUYSSEGUR, 1985, LUBART et al., 1992; LUBART et al., 1996; LUBART et al., 1997). Em ambas as situações, a célula se beneficia da luz, aumentando sua atividade metabólica, que resulta em maior velocidade mitótica (MELLO; MELLO, 2001).

5.3 - Fototerapia na cicatrização de úlceras

Há mais de trinta anos, a fototerapia, através dos *lasers* de baixa potência e *LED's*, vem sendo amplamente utilizada como ferramenta terapêutica no processo de reparação tecidual em várias áreas da saúde como medicina, fisioterapia, odontologia, entre outras. Essa terapêutica tem permanecido controversa, com muitos estudos suportando a noção original que ela promove reparação tecidual em

experimentos *in vitro*, com animais e aplicações clínicas, e outros estudos sugerindo o contrário.

5.3.1 - Fototerapia *in vitro*

Os aspectos da cicatrização de úlceras que têm sido relatados em estudos *in vitro* utilizando a fototerapia são a proliferação de fibroblastos, (LUBART et al., 1993; LUBART et al., 1995; BOLTON et al., 1995; WHELAN et al, 2000; WHELAN et al, 2001; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER, 2003; KREISLER et al., 2003), estimulação de macrófagos (YOUNG et al., 1989, RAJARATNAM et al., 1994), síntese de pró-colágeno (YAMAMOTO et al., 1996, Pereira et al., 2002) e estimulação de queratinócitos (YU et al., 1996; GROSSMANN et al., 1998).

Almeida-Lopes et al., (2001) aplicou a fototerapia (*laser* diodo) em diferentes comprimentos de onda (670 nm, 692 nm 780 nm, 786 nm), porém com a mesma fluência de 2 J/cm², em cultura de fibroblastos em dois meios de cultivo celular, meio ideal para proliferação celular (10% de soro bovino fetal) e meio com situação de estresse, apresentando déficit nutricional (5% de soro bovino fetal). Os resultados mostraram que as células em meio com déficit nutricional, apresentaram crescimento celular significativamente menor que as células no meio ideal de crescimento. No entanto, quando irradiadas, as células em meio com deficiência nutricional apresentaram crescimento similar ou maior que as células cultivadas em condições ideais para o crescimento.

Num estudo recente, foi avaliada a taxa de proliferação celular em cultura de fibroblastos humanos após irradiação com *laser* HeNe com comprimento de onda de 632 nm, potência de 3 mW/cm² e dose de 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 16 J/cm² por dois dias consecutivos. Os resultados mostraram que a dose de 5 J/cm² induziu a proliferação celular de fibroblastos quando comparado com o respectivo controle e com as doses maiores, de 10 e 16 J/cm² observou-se uma diminuição da viabilidade dos fibroblastos (HAWKINS; ABRHAMSE, 2006).

Libanore (2008) avaliou a taxa de crescimento em cultura de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphilococcus aureus* após irradiação com *laser* de diodo em dois comprimentos de onda (685 nm e 830 nm) separadamente e em associação, nas doses de 1, 2 e 4J (fluência de 33,33; 66,66 e 133,33 J/cm² respectivamente). Os resultados mostraram maior inibição do crescimento bacteriano com a dose e densidade de energia mais alta (4J e fluência de 133,33

J/cm²). O comprimento de onda de 685 nm com dose de 4J, apresentou maior taxa de inibição para a bactéria *S. aureus*, e os comprimentos de onda de 685 e 830 nm com dose de 2 e 4J apresentaram maior inibição no crescimento da bactéria *P. aeruginosa*.

5.3.2 - Fototerapia em experimentação animal

As pesquisas iniciais dos efeitos da fotoestimulação em cicatrização de úlceras utilizando modelos experimentais em animais (ratos, camundongos, coelhos, cães e porcos), foram amplamente difundidas pela Europa na década de 60. Desde então houve um grande crescimento de pesquisas sobre a fotoestimulação no reparo tecidual em modelos animais (KANA et al., 1981; BRAVERMAN et al., 1989; SOARES et al., 1989; LEE et al., 1993; AL-WATBAN; ZHANG, 1994; BROADLEY et al., 1995; AL-WATBAN, 1997; AL-WATBAN et al, 2000; DORSET-MARTIN, 2004; MENDEZ et al., 2004; BAYAT et al., 2005; PINHEIRO et al., 2006; YASUKAWA et al., 2007; LEITE et al., 2008; LIBANORE, 2008;) na tentativa de elucidar os mecanismos de ação e efeitos da fototerapia.

Whelan et al., (2001) estudaram os efeitos do *LED* produzido pela *NASA* e terapia de oxigênio hiperbárico (*HBO*), através de um modelo de úlcera isquêmica no dorso de ratos *Sprague-Dawley*. O *LED* foi utilizado no comprimento de onda de 880 nm, fluência de 4 J/cm² e potência de 50 mW/cm² por 14 dias consecutivos. Foram analisadas qualitativamente as áreas das úlceras (desenhadas manualmente, escaneadas e analisadas pelo programa *SigmaScan Pro*), e quantificado VEGF e FGF-2 por ELISA. Os resultados mostraram que os grupos, combinação *LED* e *HBO*, e *LED* sozinho, obtiveram diminuição significativa das áreas das úlceras comparada ao controle. Quanto ao nível de VEGF e FGF-2, o grupo tratado com *LED* teve um pico significativamente maior no quarto dia de tratamento quando comparado com o controle.

Foi realizado um estudo de fotoestimulação sobre a relação entre comprimentos de onda e intensidades diferentes utilizados na cicatrização de úlceras cutâneas do dorso de ratos Wistar. Foi utilizado um aparelho de *laser* de diodo nos comprimentos de onda de 670 ou 685 nm, potência de 50 mW, dose de 10J por sessão e nas intensidades de 2, 15 ou 25 mW. As amostras foram coradas com H.E. e parâmetros qualitativos como edema, hiperemia, infiltrado inflamatório e a presença e distribuição de fibroblastos, foram utilizados para avaliar o processo de

cicatrização. Os resultados mostraram maior proliferação fibroblástica nos grupos irradiados quando comparados ao controle e melhores efeitos combinando intensidades mais altas (25 mW) com comprimentos de onda menores (670 nm) ou intensidades mais baixas (2 e 15 mW) com maiores comprimentos de onda (685 nm) (NASCIMENTO et al, 2004).

Rocha Júnior et al., (2006) realizaram um estudo da fototerapia utilizando um aparelho de *laser* Arseneto de Gálio (AsGa) com comprimento de onda de 870 nm, 15 mW de potência e dose de 3,8 J/cm², três aplicações (dia da cirurgia: 48 horas e 9º dia). A análise histomorfométrica foi feita através da captura de imagens, onde foram escolhidos quatro campos aleatórios (400x) em cada lâmina para, contagem de células inflamatórias, avaliação da proliferação fibroblástica, análise da angiogênese local, e do diâmetro das áreas ulceradas no 10º dia pós-operatório, com auxílio de marcação digital. Os resultados mostraram que em todas as análises (células inflamatórias, fibroblastos, angiogênese e diâmetro das úlceras) o grupo irradiado apresentou resultados significativamente melhores quando comparado com o grupo controle.

Araújo et al., (2007) analisaram os efeitos da fototerapia na cicatrização de úlceras no dorso de camundongos *Swiss* através do *laser* HeNe com comprimento de onda 632,8 nm, 10 mW de potência e dose de 1 J/cm². Foram feitas duas úlceras no dorso de cada animal, sendo que uma era controle da outra. As aplicações foram feitas no 1º, 5º, 8º, 12º, e 15º dias pós-operatório e coletadas amostras no 8º, 15º e 22º dia para análise de reepitelização, resposta inflamatória, fibroplasia, através de histologia, autoradiografia e imunohistoquímica para miofibroblastos (anti- α -actina). Os resultados mostraram que os grupos irradiados apresentaram um processo cicatricial mais rápido, pelo estímulo, proliferação e diferenciação dos fibroblastos (miofibroblastos) e pela redução do processo inflamatório (efeito antiinflamatório) em comparação com o grupo controle.

Rezende et al., (2007), aplicaram a fototerapia em úlceras no dorso de ratos Wistar, através de um *laser* de diodo com comprimento de onda de 830 nm, potência de 60 mW e dose de 1,3 J/cm² ou 3 J/cm² irradiado nos animais uma única vez. Os diâmetros das úlceras foram medidos através de um paquímetro nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório e para análise histológica, foram fotografados quatro campos aleatórios em cada lâmina para uma avaliação semiquantitativa da continuidade da superfície epitelial, infiltrado polimornucleado, angiogênese e fibroplasia. Nos

resultados da análise do diâmetro das úlceras, no 7º dia, o grupo irradiado com dose de 1,3 J/cm² apresentou uma diminuição no diâmetro das úlceras diferente significativamente do grupo não irradiado, e no 14º dia os grupos irradiados tanto com dose de 1,3 J/cm² quanto com dose de 3 J/cm² apresentaram diferença significativa comparada com o controle. Em relação à análise histológica semiquantitativa dos parâmetros avaliados, o grupo irradiado com a dose de 1,3 J/cm² apresentou melhor resposta em relação ao grupo controle. Além disso, os grupos irradiados apresentaram uma melhor organização nas fibras de colágeno, e o grupo irradiado com 1,3 J/cm² mostrou maior organização das fibras de colágeno e uma camada epitelial mais espessa quando comparado com o grupo irradiado com a dose de 3 J/cm².

Erdle et al., (2008), avaliaram os efeitos da fotoestimulação em queimaduras e úlceras incisionais no dorso de camundongos da linhagem SKH-1, utilizando um aparelho de *LED* com comprimentos de onda de 660 e 680 nm, apresentando um pico de emissão de 670 nm, com intensidades de 40 mW/cm², 8 mW/cm² ou 1,6 mW/cm² e dose de 3,6 J/cm². As fendas das úlceras e o diâmetro das queimaduras foram fotografados para analisar a reepitelização das úlceras, e também foi realizada imunohistoquímica para proliferação celular (bromodeoxiuridina) na periferia das incisões e queimaduras. Os resultados mostraram que o *LED* em todas as intensidades usadas, apresentou uma cicatrização mais rápida das úlceras e queimaduras, diferente significativamente do grupo controle, e que a menor intensidade (1,6 J/cm²) produziu melhores efeitos comparada com as intensidades maiores (8 e 40 J/cm²). A proliferação epidérmica avaliada pelo marcador imunohistoquímico, mostrou que a proliferação foi evidente nos três grupos irradiados, porém não houve diferença significativa comparada ao controle.

Como visto, os estudos de cicatrização de úlceras em modelo animal citados, foram realizados com animais saudáveis. Todavia, a eficácia da fotoestimulação pode ser curta, pois úlceras agudas geralmente cicatrizam bem, exceto quando sofrem alguma intervenção, como em certas condições patológicas, como por exemplo, diabetes, processos infecciosos ou desnutrição. As condições para avaliação da eficácia da fototerapia estão sendo exploradas usando modelo animal de úlceras com algum processo patológico (REDDY, 2001), porém, poucos estudos têm avaliado a eficácia terapêutica desses modelos patológicos (LEE et al.,

1993; YU et al., 1997; REDDY et al., 2001; PINHEIRO et al., 2004; LEITE et al., 2008; LIBANORE, 2008).

Reddy et al., (2001) realizaram um estudo para analisar os efeitos da fototerapia em úlceras no dorso de ratos *Sprague-Dawley* diabéticos, utilizando um aparelho de *laser* HeNe, com comprimento de onda de 632,8 nm na dose de 1 J/cm². Foram feitas duas úlceras no dorso de cada animal, sendo que uma era controle da outra. Foi realizada análise biomecânica para avaliar a força tênsil das úlceras e análise bioquímica para avaliação de colágeno. Os resultados mostraram que a integridade biomecânica do tecido não lesado foi significativamente maior comparado aos grupos diabéticos controle e irradiado, porém o grupo diabético irradiado apresentou um aumento na estabilidade biomecânica das úlceras comparado ao controle diabético. A análise bioquímica indicou que o conteúdo total de colágeno no grupo irradiado foi significativamente maior comparado ao grupo controle.

Pinheiro et al., (2004), analisaram a fototerapia através de luz coerente (*laser* 635 nm, potência de 40 mW, na dose de 20 ou 40 J/cm²) e não coerente (aparelho de luz polarizada 400-2000 nm, potência de 40 mW, na dose de 20 ou 40 J/cm²), na cicatrização de úlceras no dorso de ratos Wistar nutridos e desnutridos. A desnutrição foi induzida nos animais durante trinta dias, através de dieta especial fornecida por departamento de nutrição. O tratamento com a fototerapia foi realizado diariamente durante sete dias. Foi realizada análise histológica semiquantitativa incluindo reepitelização, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica e organização das fibras de colágeno. Os resultados dessa análise semiquantitativa sugeriram que o *laser* (luz coerente) na dose de 20 J/cm² mostrou efeitos positivos nos grupos nutridos e desnutridos quando comparado com os controles, sendo que os efeitos foram mais positivos nos animais desnutridos em relação aos nutridos. Já a luz polarizada (não coerente) na dose de 20 J/cm² apresentou efeitos mais positivos nos animais nutridos em comparação aos desnutridos.

Leite et al., (2008) analisaram os efeitos do estímulo da fototerapia em úlceras dorsais de ratos Wistar nutridos e desnutridos. A desnutrição tipo marasmo foi induzida nos animais por sessenta dias, que foi confirmada através da massa corporal e dosagem de albumina sérica dos animais. O tratamento com fototerapia foi realizado com um aparelho de luz coerente (*laser* HeNe 632,8 nm, potência de 2,5 mW, dose de 3 J/cm²) e não coerente (*LED's* combinados 660/890 nm, potência

de 500 mW, dose de 3J), três vezes por semana, durante quatorze dias. Para análise da reepitelização, as úlceras foram fotografadas e posteriormente analisadas pelo programa ImageJ, através do Índice de Cicatrização das Úlceras (ICU's). Na análise histológica foram fotografadas dez regiões de interesse (*ROI's*) em cada lâmina para análise da colagênese (percentual de colágeno no tecido) através do programa ImageJ. Os resultados quanto à reepitelização, no 7º dia, mostraram que o grupo desnutrido irradiado com *LED's* apresentou melhor média dos ICU's diferente significativamente do grupo controle nutrido e nutrido irradiado com *LED's*. Quanto à colagênese, no 14º dia, o grupo controle desnutrido apresentou menor porcentagem de colágeno em relação aos demais tratamentos, diferente significativamente do grupo controle nutrido, nutrido irradiado com *laser* HeNe, desnutrido irradiado com *LED's*, desnutrido irradiado com *laser* HeNe.

5.3.3 - Fototerapia em humanos

Apesar dos estudos *in vitro* e em modelo animal apresentarem muitos benefícios com a fototerapia, poucos ensaios clínicos bem conduzidos têm sido realizados, que comprovem a eficácia da fototerapia em humanos. A maioria da literatura que suporta o uso da fototerapia no tratamento de úlceras consiste em estudos não controlados, amostras pequenas, cobertura insuficiente (estudo cego) e outras falhas metodológicas. Além disso, os estudos que avaliam a eficácia da fototerapia na cicatrização de úlceras não conseguem estabelecer um padrão para os parâmetros como, o tipo de *laser* (comprimento de onda), dosagem, frequência, ou duração do tratamento (POSTEN et al., 2005; SOBANKO; ALSTER, 2008).

Lucas et al., (2003) realizaram um ensaio clínico randomizado, multicêntrico, duplo cego para avaliar a eficácia da fototerapia como adjuvante no tratamento de pacientes com úlceras de decúbito grau III. A fototerapia foi utilizada através de *laser* de diodo AsGa no comprimento de onda de 904 nm e dose de 1 J/cm², aplicado nas úlceras 5 vezes por semana. As áreas das úlceras foram traçadas manualmente utilizando papel milimetrado para posterior análise. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na análise das áreas, entre o grupo tratado com fototerapia em relação ao grupo controle, não encontrando evidências que justifique o uso da fototerapia como adjuvante no tratamento de úlceras de decúbito grau III.

Já Caetano (2008), realizou em estudo randomizado, duplo cego, onde avaliou os efeitos da fototerapia em úlceras venosas crônicas. O aparelho de fototerapia (*LED's*) utilizado, apresentava duas sondas, a sonda 1 com apenas um diodo de 5 mW e 640 nm, foi utilizada como placebo, a sonda 2 com 36 diodos superluminosos (*SLD's*), sendo 32 diodos de 15 mW e 830 nm, e 4 diodos de 5 mW e 640 nm, numa potência resultante de 500 mW foi utilizada como tratamento. Além disso, havia um grupo que não recebeu fototerapia (controle). Todos esses parâmetros somente foram revelados após o término do estudo. As úlceras foram tratadas na dose de 3 J/cm², duas vezes por semana durante 90 dias. As úlceras foram fotografadas nos dias 30, 60 e 90 para análise das áreas, assim como tecido de granulação e fibrina, através do programa ImageJ. Os resultados mostraram que as úlceras tratadas com a sonda 2 apresentaram redução nas áreas das úlceras diferente significativamente do grupo controle nos dias 30, 60 e 90 e do grupo tratado com a sonda 1 (placebo) nos dias 30 e 90. O grupo tratado com a sonda 1 (placebo) apresentou redução das úlceras diferente significativamente do grupo controle, mas somente na avaliação de 90 dias.

Justificativa

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial torna-se rotineiro o atendimento de pacientes idosos apresentando lesões ulceradas de múltiplas etiologias como úlceras venosas, arteriais, diabéticas além das úlceras de pressão devido ao repouso prolongado conseqüente das doenças degenerativas.

Somam-se a esses, pacientes mais jovens diabéticos com mal perfurante plantar, além daqueles com história de politraumatismo ou traumatismos crânio-encefálicos que os levam ao repouso prolongado e, por conseguinte às úlceras de pressão.

Essas úlceras, associadas às condições patológicas como desnutrição, *diabetes mellitus*, infecções, hipertensão, processo compressivo prolongado (úlceras de pressão) entre outras, têm seu processo de cicatrização alterado, prolongando o tempo de reparo, agravando o quadro clínico do paciente e aumentando os custos para o sistema de saúde.

Atualmente, da mesma forma que vem aumentando a freqüência das lesões ulceradas, também aumentaram as alternativas terapêuticas no mercado. No entanto, essas são de alto custo e poucas aceleram o processo de cicatrização além do normal. A fisioterapia, como parte integrante de um contexto multidisciplinar, oferece recursos como à fototerapia, terapia por ultra-som de baixa intensidade e microcorrentes como adjuvantes no tratamento de úlceras cutâneas.

A fototerapia vem sendo utilizada através dos anos, no processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em modelos experimentais e estudos clínicos em humanos. Apesar da grande quantidade de estudos e pesquisas disponíveis sobre o assunto, a fototerapia ainda é uma ferramenta terapêutica controversa e muito discutida. Seus efeitos e mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados, o que torna importante a realização de estudos em modelos animais. Na literatura encontram-se vários modelos animais para o estudo da cicatrização de úlceras em seu processo normal, porém são raros os modelos animais que reproduzem esse processo de cicatrização em condições patológicas (desnutrição, infecções, diabetes).

Por isso torna-se relevante estudar o processo de reparação tecidual de úlceras cutâneas em um modelo animal submetido a um processo de desnutrição, com a finalidade de ampliar os conhecimentos sobre a cicatrização das úlceras e a influência da desnutrição no processo de reparo. Além disso, estudar os efeitos da

fototerapia na cicatrização de úlceras sob condições patológicas (desnutrição), para entender melhor essa interação entre cicatrização, desnutrição e fotoestimulação.

Objetivos

Geral:

Avaliar a influência de diferentes formas de fototerapia na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos sob desnutrição induzida.

Específicos:

- Avaliar as diferenças histológicas na pele íntegra entre ratos nutridos e desnutridos.
- Avaliar as diferenças na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos nutridos e desnutridos.
- Avaliar a cicatrização das úlceras cutâneas entre ratos **nutridos** e desnutridos (**modelo marasmo**) tratados pelo **laser HeNe** (632,8 nm).
- Avaliar a cicatrização das úlceras cutâneas em ratos **nutridos** e desnutridos (**modelo marasmo**) tratados por **LED's** combinados (660/890 nm).
- Avaliar a cicatrização das úlceras cutâneas em ratos **nutridos** e desnutridos (**dieta normoprotéica associada à proteína de baixa qualidade - gelatina**) tratados pelo **laser de diodo** (660 nm e 808 nm).

Animais e Métodos

1 - Experimento 1

1.1 - Seleção dos animais

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, com cerca de 2 meses de idade, pesando 180 a 200 gramas oriundos do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, onde os animais ficaram alojados em gaiolas individuais de polietileno com tampa de aço inoxidável. O ambiente foi mantido em temperatura constante de 22° C, com umidade relativa do ar em torno de 60% e com exaustão de ar automática. Luz artificial em um ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas (6h-18h). Os animais receberam água *ad libitum*. Esse projeto está de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, processo 274/2005 (vide Anexo A).

1.2 - Padronização do modelo de animal nutrido e desnutrido

O modelo dos animais desnutridos foi baseado na desnutrição proteico-energética do tipo **marasmo**. Os ratos foram pesados no dia de chegada ao biotério. Durante os três dias consecutivos, os sessenta animais foram submetidos a um controle de dieta para o cálculo da média de ingesta (28g). Em seguida, 30 animais escolhidos aleatoriamente receberam ração *ad libitum* e o restante, animais do grupo desnutrido, recebeu a metade (50%) da média de ingestão diária de todos os nutrientes que foi 14g. Esse procedimento foi realizado durante dois meses para induzir desnutrição.

1.3 - Confirmação do estado nutricional

1.3.1 – Massa corporal

Para a confirmação do estado nutricional foi feito o acompanhamento da massa corporal dos animais. Os animais foram pesados em uma balança digital calibrada no dia que chegaram ao biotério e após 60 dias de desnutrição.

1.3.2 - Dosagem de albumina sérica

A partir da punção da veia caudal foi coletada uma amostra de sangue de 1 ml para dosagem da albumina sérica que foi realizada no Laboratório de Nutrição

da FMRP-USP. Foram feitas três coletas da albumina, sendo a primeira, realizada três dias antes do início da desnutrição e após o 30° e 60° dias de desnutrição.

1.4 - Procedimento cirúrgico

Os animais receberam anestesia geral intraperitoneal (hidrato de cloral - 4%, 1 ml / 100g do animal), e em seguida foi realizada a tricotomia no dorso dos animais. Logo após, foram feitas duas úlceras no dorso de cada animal usando um *punch* de 8 mm de diâmetro e posteriormente lavadas com soro fisiológico 0,9%. Nenhum curativo foi realizado e os animais retornaram às gaiolas após a aplicação da fototerapia e fotografias, sendo observados até o retorno às atividades após anestesia.

Para acompanhamento histológico do estado nutricional da pele e dos tratamentos, foram coletadas 10 amostras de pele dos animais nutridos e 10 amostras dos desnutridos durante o procedimento cirúrgico inicial. No 15° dia de seguimento, os animais foram sacrificados por decapitação, sendo coletadas 10 amostras das áreas cicatriciais dos 6 grupos de estudo, utilizando *punch* 8 mm. Essas amostras foram imersas em TissueTek[®] e guardadas em freezer -70°C.

1.5 - Aparelhos de fototerapia

Para a fototerapia foram utilizados dois aparelhos: *laser HeNeplus[®] New* (KW Ltda, Amparo, Brasil), emissor de luz coerente, contínua, comprimento de onda de 632,8 nm, potência de 3 mW (Figura 6), e o *Dynatron Solaris 705[®] 880 Infrared Cluster Probe* (Dynatronics Corporation, Salt Lake City, USA) que apresenta sonda de 5cm² constituída por 36 diodos superluminescentes (SLD's) inter espaçados por associação de 32 diodos de 890 nm / 15 mW e 4 diodos de 660 nm / 5 mW, com potência média de 500 mW ou 100 mW/cm². (Figura 7). O tempo de aplicação foi pré-determinado pelos aparelhos de acordo com a fluência escolhida.



Figura 6: Aparelho *HeNeplus® New*



Figura 7: Aparelho *Dynatron Solaris 705® 880 Infrared Cluster Probe*

1.6 - Padronização dos grupos

Os animais foram então divididos em 6 grupos de 10 animais cada, sendo três grupos de animais nutridos (**N**), e três de animais desnutridos (**D**), a saber:

Grupo Nutrido Sham (GNS): animais nutridos cujas úlceras foram submetidas a fototerapia com aparelho desligado (posição *off*).

Grupo Nutrido LED (GNL): animais nutridos cujas úlceras foram submetidas a fototerapia pelo *Dynatron 705*[®] na dose de 3J.

Grupo Nutrido HeNe (GNH): animais nutridos cujas úlceras foram submetidas a fototerapia pelo *laser HeNe* na dose de 3J.

Grupo Desnutrido Sham (GDS): animais desnutridos cujas úlceras foram submetidas a fototerapia com aparelho desligado (posição *off*).

Grupo Desnutrido LED (GDL) animais desnutridos cujas úlceras foram submetidas à fototerapia pelo *Dynatron 705*[®], na dose de 3J.

Grupo Desnutrido HeNe (GDH): animais desnutridos cujas úlceras foram submetidas a fototerapia pelo *laser HeNe*, na dose de 3J.

1.7 - Padronização do procedimento da fototerapia

A fototerapia foi aplicada pontualmente sobre a úlcera a qual estava protegida por filme plástico tipo PVC, sendo a primeira aplicação imediatamente após o procedimento cirúrgico e depois as irradiações foram feitas três vezes por semana, durante 14 dias, diferenciando apenas o tipo de *laser* aplicado, conforme a padronização dos grupos acima pré-estabelecidos.

1.8 - Captura e análise de imagens

As úlceras foram fotografadas nos dias 0, 7° e 14° dia pós-operatórios por câmera Digital Sony P41 no tamanho de 4 megapixels, sem *flash* e sem *zoom*, que foi fixada em um aparelho padronizado para captura de imagens, apresentando uma régua milimetrada com referência de medida, confeccionado na Oficina de Precisão da FMRP-USP (Figura 8).

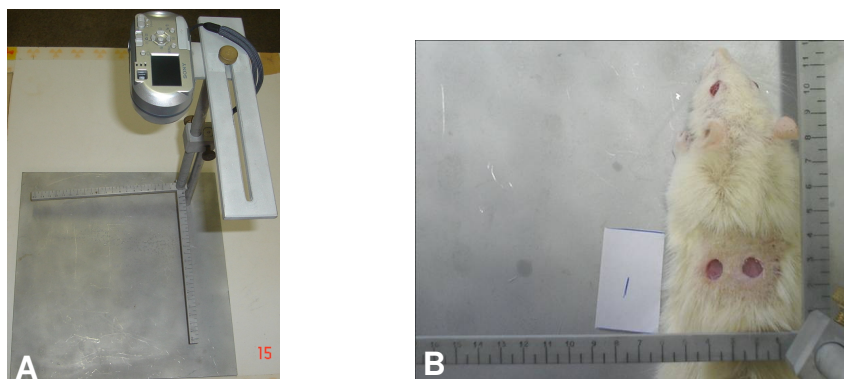


Figura 8: **(A)**. Suporte padronizado para captura de imagens. **(B)**. Posicionamento do animal para a captura de imagens das úlceras cutâneas dorsais.

Posteriormente, as imagens foram transferidas ao computador e as áreas das úlceras foram analisadas pelo programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que é um processador e analisador de imagens em JAVA de domínio público inspirado no *NIH Image* da *Apple Macintosh*. Dessa forma executa em diversos tipos de máquinas e ambientes desde que os mesmos possuam uma máquina virtual Java apropriada. O ImageJ vêm sendo utilizado como ferramenta alternativa para resolver tarefas comuns de análise de imagens microscópicas e ultraestruturais. Ele não é somente um programa de análise morfométrica, mas também adaptável a diversas tarefas na rotina laboratorial, como mensuração de áreas teciduais, contagem de células, quantificação imunohistoquímica da expressão de anticorpos e contagem de partículas em microscopia imunoelétrica (PAPADOPULOS et al., 2007; NOURSADEGHI et al., 2007; DELLO et al., 2007; CAETANO et al., 2008; SIEUWERTS et al., 2008; HEWIT; RESTINGER, 2008; ROSZIK et al., 2008).

1.9 - Avaliação da cicatrização das úlceras

A documentação fotográfica das úlceras dos seis grupos, nos dias 0, 7° e 14° pós-operatórios foi analisada pelo programa ImageJ segundo o procedimento a seguir:

- Após a abertura da imagem no programa ImageJ foi realizada a padronização da medida em mm no plugin *Analyse/Set Scale*, o polígono foi selecionado para a execução do delineamento manual com o mouse nas bordas da úlcera. A seleção da borda delineada foi salva com a extensão *ROI*. Após esse procedimento, ao clicar <CTRL+M> o software calcula automaticamente a área da úlcera em mm² (Figura 9).

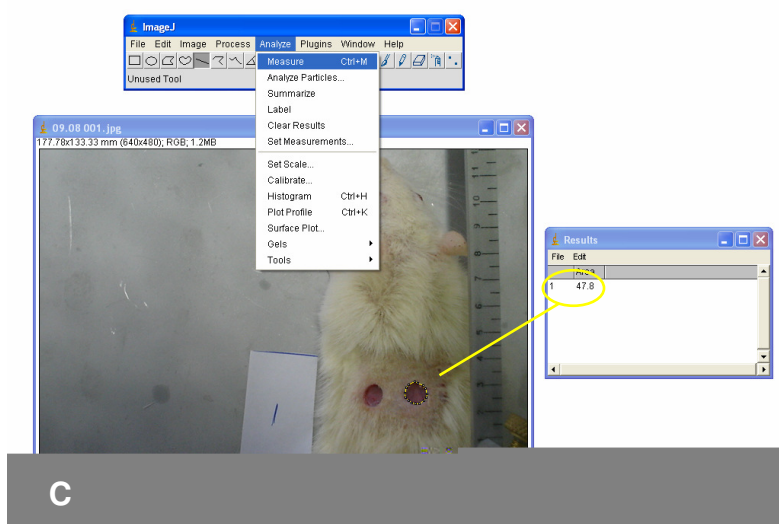
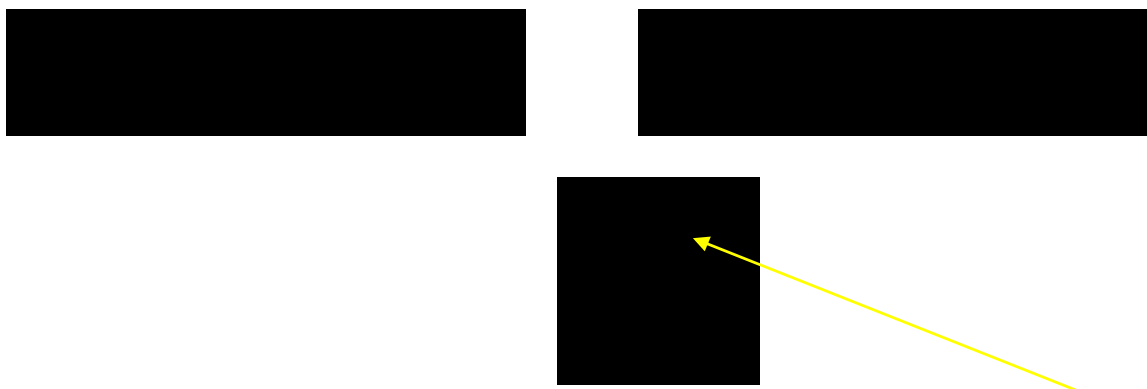


Figura 9: Esquema ilustrativo da análise das áreas das úlceras através do programa ImageJ **(A)** Delimitação da área da úlcera **(B)** Colocação da escala **(C)** Resultado da área em milímetros

Whelan et al., (2001) e Wellenstein et al., (2004) utilizaram medidas de percentuais de cicatrização de úlceras. No entanto, Rocha-Jr. et al., (2006) utilizou a média dos diâmetros das úlceras para avaliar a reepitelização. Dessa forma, foi utilizado o Índice de cicatrização das úlceras (ICU's), medidas de forma normalizada, calculada no 7° e 14° dia pós-operatório, conforme a equação abaixo, onde ICU = Índice de Cicatrização de Úlceras; Ai = área inicial; Af = área final.

$$ICU = \frac{Ai - Af}{Ai}$$

O ICU representa o resultado da diferença entre a área inicial (tempo 0) e área final (tempo f) dividido pela área inicial tendo como base a reepitelização

ANEXO B – Laudo de calibração do laser HeNePlus New

Certificado de Calibração

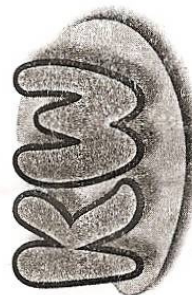
Certificamos que o equipamento abaixo foi testado e calibrado dentro de padrões rigorosamente definidos pela KW-ELETRÔNICA conforme especificações indicadas no Manual de Instruções e Operações.

HENEPLUS
#NEW
000611

14 / 07 / 07

Data

[Assinatura]
Responsável Técnico



KW Indústria Nacional de Tecnologia Eletrônica Ltda
Av. Augusto Barassa, 1211 e 1241 - Jd. Juliana - CEP 13904-990 - Cx. Postal 2710
Amparo / SP - Brasil - ☎(0XX19) 3807 5100 - Fax (0XX19) 3807 6774
Autorização de Funcionamento nº 102.446-3
kweletronica.com.br kw@kweletronica.com.br

ANEXO C – Laudo de calibração do *laser Flash Lase*

São Carlos 14 de Março de 2008.

Laudo de Calibração

O equipamento Flash Lase III com número de série **686** foi aferido utilizando o conjunto de medidores da Coherent LM-10 HTD e Coherent Smart Sensor Interface Module.

Características dos lasers utilizados no equipamento Flash Lase III.

Laser vermelho: comprimento de onda 660 nm, 100mW de potência líquida.

Laser Infravermelho: comprimento de onda 808 nm, 100mW de potência líquida.

Características do meio de transmissão:

Fibra óptica de 0.6mm de diâmetro, 78mm de comprimento e abertura numérica 0,48.

O equipamento foi submetido a calibrações de potências. Os testes realizados após sua aferição foram satisfatórios, atendendo todos os requisitos necessários para o seu pleno funcionamento.

Aferido por



Fernando Nogueira
Departamento Técnico.

DMC Equipamentos LTDA
São Carlos, 14 de Março de 2008