



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ablação de pele queimada com laser de pulsos ultra-curtos para promoção da cicatrização. Avaliação por tomografia por coerência óptica, histologia, μ ATR-FTIR e microscopia não-linear

Moisés Oliveira dos Santos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2012**





Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Ablação de pele queimada com laser de pulsos ultra-curtos
para promoção da cicatrização. Avaliação por tomografia
por coerência óptica, histologia, μ ATR-FTIR e microscopia
não-linear

Moisés Oliveira dos Santos

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Denise Maria Zezell

São Paulo

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luis Nogueira e Sebastiana Santos, que com seu esforço, carinho e dedicação me apoiaram nos meus sonhos e desejos.

Obrigado mãe!

Obrigado pai!

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Denise Maria Zezell, minha orientadora, pela amizade, carinho, paciência e orientação acadêmica.

A Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, pelas profícuas discussões e uso seu laboratório.

Aos Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr., Prof. Dr. Wagner de Rossi, Prof. Dr. Ricardo Elgul Samad, Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas e Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar pela disponibilização da infraestrutura laboratorial e trocas de idéias.

Aos professores e pesquisadores que me ajudaram a construir meu conhecimento e me ensinaram com suas experiências a arte da pesquisa científica.

Ao Sr. Antonio Bobrovec e a Sra. Aparecida Bobrovec pelo incentivo, ajuda, amizade e carinho.

Aos meus irmãos, Lúcia, Jorge, Sérgio e Peterson pelo incentivo na minha jornada e admiração pela coragem.

A Ticiane que me apoiou e incentivou durante toda a pós-graduação.

A minha amiga, Claudia Roessing pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis que passei.

A minha grande amiga Luciana, a Brima, que me ajudou muito nesses anos.

À Márcia Neiva e a Márcia Viviane por toda ajuda.

Aos meus amigos Biofotônicos: Cláudia Zamataro, Cláudia Strefezza, Patrícia da Ana, Paulo Roberto, Marcelo Veloso, José Quinto e Thiago Pereira pelos momentos de alegria, descontração e adrenalina.

À minha grande amiga Viviane Goulart pelas caronas, amizade e pelo apoio incondicional nas dificuldades do caminho.

À minha amiga Carolina Benetti, pelas longas conversas, conselhos e estatísticas.

Aos amigos de "Ribeirão": Airton, Lindomar, Lucas, Mirko e Rotta, que apesar das distâncias que a vida nos impôs, estiveram sempre em contato.

Às minhas irmãzinhas acadêmicas: Leila Mostaço, Laís Paulino e Marina Sanches, muito obrigado por tudo e até a "Federal do Tocantins".

Ao Ayrton Kondo, Juliane Sanches, Fernanda, Ambart e Rodolfo, pela ajuda nos momentos em que ousei ser histologista.

Aos amigos: Ana Claudia Ballet, Gláucia, Letícia Sicchieri, Deborah, Ilka Kato, Renato Prates, Leandro Matioli, Marcelo Magri(Butico #1), Marcos Raele(Butico #2), valeu!

As secretárias do Centro de Lasers e Aplicações e da CPG pela ajuda prestada.

Aos técnicos: Valdir, Marcão, Paulinho e Tort pela ajuda prestada na montagem do experimento.

À todos, que de uma forma ou de outra me ajudaram nessa jornada;

À FAPEAM, pela bolsa concedida por meio do programa RH-POSGRAD.

Ao CNPq/INCT, Instituto Nacional de Fotônica - 573916/2008-0, pelo auxílio ao projeto.

À FAPESP/CEPID – Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica(CEPOF) 05/051689-2 pelo auxílio através do projeto.

Ablação de pele queimada com laser de pulsos ultra-curtos para promoção da cicatrização. Avaliação por tomografia por coerência óptica, histologia, μ ATR-FTIR e Microscopia Não-Linear

Moisés Oliveira dos Santos

Resumo

As queimaduras causam alterações na estrutura anatômica da pele associadas a trauma. As queimaduras podem ser classificadas em lesões de primeiro, segundo e terceiro grau. As queimaduras de terceiro grau têm sido grande foco de pesquisas em busca de tratamentos mais conservadores e de maior rapidez no reparo para um resultado funcional e estético satisfatório. O tratamento convencional consiste no uso de medicamentos tópicos e no enxerto de pele natural ou sintética. Alternativamente, a terapia laser utiliza o processo de ablação para remoção do tecido queimado necrosado, devido ao não contato mecânico, à rapidez na aplicação e alcance a áreas de difícil acesso. Deste modo, a proposta deste estudo é avaliar a viabilidade de utilizar lasers de femtossegundos de altíssima intensidade como coadjuvante no tratamento de pacientes queimados. Para o estudo, foram utilizados 25 ratos da raça Wistar, divididos em grupos de 5 animais: grupos pele sadia, pele queimada, dois tipos de tratamento (desbridamento cirúrgico ou ablação a laser de femtossegundos) e em quatro tempos de acompanhamento do processo cicatricial. Três regiões do dorso dos animais foram expostas a fonte de vapor causando queimadura de terceiro grau. No terceiro dia após a queimadura, uma das regiões foi ablacionada com laser de altíssima intensidade de pulsos ultracurtos ($\lambda = 785\text{nm}$, 90 fs, 2 kHz e 10 $\mu\text{J/pulso}$); outra recebeu o desbridamento cirúrgico; e a última foi considerada o controle de queimadura. As regiões foram analisados por tomografia por coerência óptica (OCT), histologia, reflectância total atenuada por espectroscopia no infravermelho usando transformada de Fourier (μ ATR-FTIR), microscopia de fluorescência por excitação de dois fótons (TPEFM) e a técnica de geração de segundo harmônico (SHG), nos dias 3, 5, 7 e 14 após os tratamentos. Os resultados mostraram que nas condições de irradiação utilizadas foi possível obter remoção de *debris* de queimadura de terceiro grau. As técnicas utilizadas para caracterização do tecido permitiram verificar que em todos os tratamentos houve a promoção da reparação tecidual. No décimo quarto dia, a curva de regeneração mostrou que o coeficiente de atenuação do tecido ablacionado a laser converge para os valores da pele sadia, porém as fibras de colágeno ainda não atingiram a mesma organização das fibras presentes na pele sadia.

Palavras-chave: Queimadura, femtossegundos, OCT, histologia, μ ATR-FTIR, TPEFM, SHG.

Ablation of burned skin with ultra-short pulses laser to promote healing. Evaluation by optical coherence tomography, histology, μ ATR-FTIR and Nonlinear Microscopy

Moisés Oliveira dos Santos

Abstract

Burns cause changes in the anatomical structure of the skin associated with trauma. The severity of the burn injury is divided into first, second and third-degree burns. The third-degree burns have been a major focus of research in search of more conservative treatments and faster results in repair for a functional and cosmetically acceptable. The conventional treatment is the use of topical natural or synthetic skin graft. An alternative therapy is the laser ablation process for burned tissue necrosis removal due to the no mechanical contact, fast application and access to difficult areas. The purpose of this study is to evaluate the feasibility of using high intensity femtosecond lasers as an adjunct treatment of burned patients. For this study, 65 Wistar rats were divided into groups of five animals: healthy skin, burned skin, two types of treatment (surgical debridement or femtosecond laser ablation) and four different times in the healing process monitoring. Three regions of the back of the animals were exposed to steam source causing third-degree burn. On the third day after the burn, one of the regions was ablated with high intensity ultrashort laser pulses ($\lambda = 785$ nm, 90 fs, 2 kHz and 10 μ J/ pulse), the other received surgical debridement, and the last was considered the burn control. The regions were analyzed by optical coherence tomography (OCT), histology, attenuated total reflectance infrared spectroscopy using Fourier transform (μ -ATR-FTIR), two-photon excitation fluorescence microscopy (TPEFM) and second harmonic generation technique (SHG) on days 3, 5, 7 and 14 pos-treatments. The results showed that with the laser irradiation conditions used it was possible to remove debris from third degree burn. The techniques used to characterize the tissue allowed to verify that all treatments promoted wound healing. On the fourteenth day, the regeneration curve showed that the attenuation coefficient of laser ablated tissue converges to the values of healthy skin, but collagen fibers have not yet reached the same organization of those in the healthy skin

Keywords: Burns, femtosecond laser, OCT, histology, μ ATR-FTIR, TPEFM, SHG.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.2. A Pele – Anatomia e Função	10
1.2.1. Epiderme	11
1.2.1.1. Camada basal.....	12
1.2.1.2. Camada espinhosa.....	13
1.2.1.3. Camada granulosa	13
1.2.1.4. Camada lúcida	13
1.2.1.5. Camada córnea	13
1.2.2. Derme.....	14
1.3. Laser de Pulsos Ultracurtos	14
1.4. Espectrometro no Infravermelho por Transformada de Fourier	18
1.5. Interferômetro de Michelson	18
1.6. ATR-FTIR.....	20
1.7. Microscopia Não-Linear.....	21
1.7.1. Second Harmonic Generation - SHG	21
1.7.2. Microscopia de Fluorescência por Excitação de Dois Fótons – TPEFM	24
1.8. Tomografia por Coerência Óptica - OCT	25
2. Objetivo	28
2.1. Geral.....	28
2.2. Específico	28
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Planejamento do estudo.....	29
3.2. Animais.....	30
3.3. Análises	31
3.3.1. Tomografia por coerência óptica (OCT)	31
3.3.1.1. Análise dos dados	32
3.3.2. Histologia.....	33
3.3.3. Microscopia Não-Linear	33
3.3.3.1. Análise dos dados	34
3.3.4. Espectroscopia por ATR-FTIR	35
3.3.4.1. Análise dos dados	35
3.4. Ablação laser	36
3.5. Análise estatística	38
4. Resultados	39
4.1. Avaliação clínica das queimaduras	39
4.2. Caracterização das amostras por histologia	40
4.2.1. Pele sadia	40
4.2.2. Pele queimada.....	42
4.2.3. Pele desbridada.....	45
4.2.4. Pele ablacionada	48
4.3. Caracterização das amostras por OCT	51
4.3.1. Pele sadia	51
4.3.2. Pele queimada.....	53
4.3.3. Pele queimada e tratada por desbridamento.....	55
4.3.4. Pele queimada e tratada por ablação.....	56

4.4.	Caracterização das amostras por ATR-FTIR	60
4.5.	Caracterização das amostras por microscopia não-linear.....	69
4.5.1.	Pele sadia	69
4.5.2.	Pele queimada	72
4.5.3.	Pele queimada e tratada por desbridamento	75
4.5.4.	Pele queimada e tratada por ablação	77
5.	Conclusões	81
6.	Perspectivas e proposições	83
7.	Referências	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura da pele e seus apêndices dérmicos.	11
FIGURA 2 - Epiderme e suas camadas.	12
FIGURA 3 - Derme e suas estruturas.	14
FIGURA 4 - Diagrama da ionização multifóton no potencial atômico.	15
FIGURA 5 - Fotoionização por tunelamento.	16
FIGURA 6 - Imagem esquemática de um arranjo FTIR que é baseado no interferômetro de Michelson.	19
FIGURA 7 - Representação da profundidade de penetração da onda evanescente na amostra.	21
FIGURA 8 - Diagrama representativo da geração de segundo harmônico em um material que não possui centro de simetria.	24
FIGURA 9 - Diagrama de Jablonski para (A) excitação por um fóton e (B) excitação por dois fótons.	25
FIGURA 10 - Ilustração esquemática de um arranjo OCT ³¹	27
FIGURA 11 – Delineamento experimental das fases do estudo: geração da lesão, tratamento e análise.	30
FIGURA 12 - Montagem da fonte de vapor para realização de lesão térmica nos animais.	31
FIGURA 13 - Estimativa da orientação do feixe de colágeno pela razão da largura (L) pelo comprimento (C) da transformada de Fourier aplicada à região de interesse da imagem.	34
FIGURA 14 – Densidade de energia em função da profundidade atingida com somente uma varredura, sem sobreposição de pulsos. O melhor ajuste de curvas para o conjunto de pontos é: $P = 187,53xDE^{0,21}$	37
FIGURA 15 – Densidade de energia em função da profundidade (log x log) com 5 varreduras por área. O melhor ajuste de curvas para o conjunto de pontos é: $P = 118,24xDE^{0,54}$	37
FIGURA 16 - (a) Aspecto da queimadura após a exposição à fonte de vapor; (b) Aspecto da queimadura após a delimitação (3º dia após queimadura)	39
FIGURA 17 – Nos cortes histológicos com espessura de 5µm, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, da pele sadia do dorso de ratos Wistar. (A) Estrutura normal da pele, com as camadas de epiderme, derme intactas e seus apêndices dérmicos; aumento 10x. (B) e (C). Na epiderme, observa-se os queratinócitos nas suas fases de diferenciação; na derme apresenta-se a sua distribuição usual de colágeno formando feixes de fibras; aumento de 20x e 60x, respectivamente.	41
FIGURA 18 - Análise histológica de cortes de 5µm de espessura, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, de pele queimada do dorso de ratos Wistar. (A1) Estrutura da pele desorganizada, com as camadas de epiderme e derme possuindo vários folículos pilosos em corte transversal; aumento 10x. (A2) Estrutura da pele apresenta mais organização em relação ao terceiro dia, embora haja a presença de alguns folículos pilosos, em corte transversal, no epitélio. (B1) Epitélio em regeneração, apresentando irregularidade no número de camadas das células e descolamento da derme; aumento 20x. (B2) Epitélio mais exuberante, com mais camadas de células e cortes transversais de folículos pilosos; aumento 20x. (C1) e (C2) Detalhe do epitélio em aumento de 60x. No	

terceiro dia apresenta um descolamento do epitélio, no quinto dia o epitélio apresenta um infiltrado.	43
FIGURA 19 - (A3) Corte histológico no sétimo dia, apresentando folículos pilosos e epitélio irregular com reentrâncias invaginando alguns folículos e numero de células em suas camadas variável; aumento 10x. (A4) Epitélio contínuo, com corte tangencial de glândulas sebáceas e muitos fibroblastos; aumento 10x. (B3) Cortes transversais de folículos pilosos incrustado na crosta da lesão e invaginados no epitélio; aumento 20x. (B4) Epitélio apresentando o estrato córneo e irregularidades na sua porção interna; aumento 20x. (C3) e (C4) Detalhe do epitélio no sétimo e décimo quarto dia. Epitélio apresenta maior espessura no décimo quarto dia que no sétimo dia, e seus estratos granuloso, lúcido e córneo, mais discretizados.	44
FIGURA 20 – Cortes histológicos com 5µm de espessura, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, de pele, do dorso de ratos Wistar, queimado e desbridado mecanicamente. (A1) Visão geral da pele, com uma crosta espessa, um epitélio em descamação, e a derme com tecido conjuntivo denso, e ausência de musculatura estriada esquelética; aumento 10x. (A2) Visão geral da pele no quinto dia, superfície coberta por uma crosta fina, epiderme e derme definidas, e presença de musculatura estriada esquelética; aumento 10x. (B1) Aumento maior da interface entre o tecido conjuntivo e a crosta, possuindo entre eles um epitélio não formado e em descamação; aumento 20x. (B2) Detalha da derme, com uma glândula sebácea no centro do campo e um epitélio em regeneração coberto por uma crosta; aumento 20x. Em (C1) e (C2) visualizamos o epitélio em detalhe com uma porção do conjuntivo, evidenciando estágios diferentes na regeneração	46
FIGURA 21 – Cortes histológicos de pele queimada e desbridada no sétimo (A3) e décimo quarto dia de acompanhamento (A4); aumento 10x. Detalhe da epiderme e derme em regeneração no sétimo (B3) e décimo quarto dia (B4); aumento 20x. Em (C3) e (C4) observa-se o epitélio exuberante, com suas camadas regeneradas; aumento 60x.	47
FIGURA 22 – No corte histológico do terceiro dia (A1), o campo mostra uma completa desorganização do tecido, com lesão intensa da musculatura estriada esquelética devido a temperatura; aumento 10x. (B1) Detalhe de folículos pilosos em corte transversal; aumento 20x. (C1) Detalhe da área do epitélio mostrando o início da reorganização de suas camadas; aumento 60x. No quinto dia (A2), observa-se uma visão geral do campo, com a ausência de epitélio, e alguns adipócitos próximo a superfície; aumento 10x. (B2) Detalhe do epitélio em regeneração; aumento 20x. (C2) Observa-se no corte o epitélio em regeneração sobrepondo-se a crosta da lesão; aumento 60x.	49
FIGURA 23 – No corte histológico do sétimo dia (A3), observa-se uma visão geral do campo, com uma reorganização do tecido em camadas e alguns folículos pilosos em corte transversal; aumento 10x. No décimo quarto dia (A4), observa-se no campo o tecido organizado, com vasos sanguíneos e glândulas sebáceas; aumento 20x. (C4) Observa-se o detalhe do epitélio queratinizado e suas camadas regeneradas ; aumento 60x.	50
FIGURA 24 - Imagem de OCT <i>in vivo</i> de pele sadia de rato Wistar	51
FIGURA 25 - Perfil médio de atenuação do sinal medido de 1500 µm da região de interesse da imagem de OCT com comprimento de onda de 930 nm. A linha vermelha na curva foi usada para determinar o coeficiente de atenuação total.	53
FIGURA 26 - Imagem de OCT <i>in vivo</i> de pele de ratos Wistar, queimada por exposição à fonte de vapor e sacrificado no 3º, 5º, 7º e 14º dia.	54

FIGURA 27 - (A) Imagem superficial da lesão, onde a linha traceja indica a posição aproximada da região de interesse do OCT. (B) Imagem de OCT <i>in vivo</i> de pele queimada de ratos Wistar, com debridamento cirúrgico no dia zero e sacrificados no 3º, 5º, 7º e 14º dia.....	56
FIGURA 28 - (A) Imagem superficial da lesão, onde a linha tracejada indica a posição aproximada da região de interesse do OCT.(B) Imagem de OCT <i>in vivo</i> de pele queimada de ratos Wistar, ablacionada com laser de femtossegundos com energia de 10 μ J no dia zero e sacrificados no 3º, 5º, 7º e 14º dia.	58
FIGURA 29 - Coeficiente de atenuação total relativo das amostras de pele queimada e queimada submetida a tratamento em função do tempo de acompanhamento da cicatrização.	59
FIGURA 30 - Espectro de absorção obtido de pele sadia na região espectral de 4000 cm^{-1} a 800 cm^{-1}	62
FIGURA 31 - Espectro de absorção obtido de pele queimada. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm^{-1} , sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm^{-1} e 800 cm^{-1} ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm^{-1} e 2500 cm^{-1}	64
FIGURA 32 - Espectro de absorção obtido de pele queimada e submetida ao tratamento por desbridamento. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm^{-1} , sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm^{-1} e 800 cm^{-1} ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm^{-1} e 2500 cm^{-1}	65
FIGURA 33 - Espectro de absorção obtido de pele queimada e submetida ao tratamento por ablação laser. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm^{-1} , sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm^{-1} e 800 cm^{-1} ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm^{-1} e 2500 cm^{-1}	66
FIGURA 34 - Razão entre as áreas sob as bandas de Amida I e Amida II, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.	67
FIGURA 35 - Razão entre as áreas sob as bandas de Amida III e Amida I, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.	68
FIGURA 36 - Razão entre as áreas sob as bandas de OH e Amida I, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.	68
FIGURA 37 - Imagens representativas de seção perpendicular da derme de pele sadia com espessura do corte de 20 μm . A amostra foi excitada com comprimento de onda centrado em 940 nm. (A) Imagem de SHG transmitido da região da derme; aumento de 40x. (B) Imagem de TPEFM com filtro de emissão na faixa de 520 a 560 nm; aumento de 40x. (C) Sobreposição das imagens de SHG e TPEFM nos modos transmitido e refletido; ; aumento de 40x. Barra de escala: ()= 100 μm	71
FIGURA 38 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada, com espessura de 20 μm . As colunas representam as técnicas de microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise. Barra de escala: ()= 100 μm	74
FIGURA 39 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada e tratada por desbridamento, com espessura de 20 μm . As colunas representam as técnicas de	

microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise; aumento 40x. Barra de escala: ()= 100 μm.....	76
FIGURA 40 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada e tratada por desbridamento, com espessura de 200μm. As colunas representam as técnicas de microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise; aumento 40x. Barra de escala: ()= 100 μm.....	78
FIGURA 41 - Índice de orientação do colágeno das amostras de pele queimada e submetidas a tratamento durante o processo de acompanhamento da cicatrização.	79

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A pele é considerada o maior órgão do corpo e representa aproximadamente 7% do peso corporal, possuindo diferentes funções¹. Sua integridade é importante para a termorregulação, proteção, função metabólica e sensibilidade. Histologicamente a pele é constituída por epiderme e derme, as quais são firmemente aderidas umas a outra. Em continuidade e logo abaixo da derme, encontra-se a hipoderme ou camada subcutânea a qual não faz parte da pele, servindo como fáscia da anatomia macroscópica. De acordo com sua espessura a pele é classificada em pele espessa, com espessura maior que 5 mm; e pele delgada, com espessura variando de 1 a 2 mm.

A pele é uma eficiente barreira protetora. Alterações na sua estrutura anatômica podem ser provocadas por danos físicos, químicos e microbiológicos. Dentre os danos físicos, as queimaduras, causam alterações na estrutura anatômica da pele associadas ao trauma. A gravidade das queimaduras é dividida em lesões de primeiro, segundo e terceiro grau. As queimaduras de primeiro grau envolvem somente a camada da epiderme, sendo também denominadas de queimaduras epidermais; as queimaduras de segundo grau recebem uma subclassificação quanto a sua profundidade: queimaduras de extensão superficial parcial e profundidade de espessura parcial. As queimaduras de extensão superficial parcial, são caracterizadas por atingirem a camada mais superior da derme, a camada papilar; as queimaduras de espessura parcial estende-se pela derme atingindo a sua camada reticular, ou camada subdérmica. A mais severa das lesões, a queimadura de terceiro grau envolve todas as camadas da derme².

Em recentes décadas, os métodos de tratamento de queimaduras tem sido modificados com o objetivo reduzir o tempo de hospitalização, melhorando a relação custo-benefício. O desbridamento cirúrgico³ do tecido queimado é a mudança mais significativa, pois permite a diminuição das complicações da cicatrização, diminuição nos custos e período de hospitalização do paciente⁴.

A determinação da profundidade da lesão na queimadura é o fator chave do direcionamento do tratamento. Os métodos de determinação são de grande interesse

clínico para medidas objetivas e reprodutivas. O exame clínico é o método de medida mais clássico e subjetivo para avaliação da profundidade da lesão de queimadura. O cirurgião baseia-se na aparência da queimadura, coloração, perfusão sanguínea no local e sensibilidade⁵.

A avaliação histológica tem sido considerada o padrão ouro da avaliação da profundidade das queimaduras, porém com ressalvas, visto que é uma técnica demorada, e necessita de um patologista experiente. Técnicas de uso restrito em laboratórios de pesquisa podem ser propostas como alternativas por serem menos invasivas, ou permitirem um estudo das características bioquímicas do tecido lesionado⁶.

Apesar dos avanços na avaliação e terapia de queimados, as infecções permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade causadas pela área lesionada da queimadura. A lesão infectada não só cicatriza mais lentamente como também pode levar a infecção sistêmica e impede a utilização e integração do enxerto de pele. O tratamento incorreto da queimadura pode levar ao aumento do tamanho e/ou profundidade da ferida. O desenvolvimento de agentes tópicos antibacterianos tem diminuído as infecções relacionadas às lesões, bem como sua morbidade quando usados apropriadamente. Emplastro gel à base de carboximetilcelulose tem sido empregado para proteger e auxiliar na cicatrização das queimaduras⁷. O principal objetivo desse tratamento conservador é fornecer umidade à ferida e reduzir a citotoxicidade do sistema conservante, promovendo um rápido reparo da área lesionada. Outras coberturas com tampões medicamentosos a base de prata, sulfonamidas, cério e clorexidina também são utilizados⁶. Paralelo ao desenvolvimento de métodos de excisão e reconstrução da pele, os lasers vem sendo cada vez mais utilizados na medicina moderna nas áreas de diagnóstico, terapia e cirurgia.

Desde sua invenção o laser tornou-se um instrumento poderoso na medicina, sendo aplicado como ferramenta de tratamento ou diagnóstico. A palavra Laser é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, sendo uma fonte de radiação eletromagnética com características intrínsecas, tais como: monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade, que a diferenciam das demais fontes de luz. O laser pode ser empregado para a remoção de material por ablação térmica (remoção por decomposição

térmica) o qual mostra-se como um método preciso usado em todos os tipos de tecidos biológicos.

Nesse tipo de interação a energia do feixe laser é absorvida pelo tecido elevando a temperatura na região causando evaporação. Na ablação mediada por plasma o tecido é removido minimizando os danos térmicos. Esse mecanismo de ablação ocorre quando a intensidade do feixe é superior ao limiar de ablação do tecido ocasionando uma quebra das ligações eletrônicas no material. A geração do plasma resulta em altas temperaturas, em uma mistura de íons e elétrons livres. Os lasers de pulsos ultra-curtos podem ter a vantagem de ser relativamente rápidos na sua aplicação, com quase nenhum sangramento⁸.

A técnica OCT (Optical Coherent Tomography ou Tomografia por Coerência Óptica), fornece uma medida direta da amplitude da luz retroespalhada ao longo de um eixo vertical dentro do volume da amostra, fornecendo informações sobre a microestrutura do tecido e propriedades ópticas do tecido.

Para um estudo qualitativo ou quantitativo dos compostos bioquímicos que compõe a pele (proteínas, lipídios etc), a técnica de μ ATR-FTIR (Reflectância total atenuada usando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier), possibilita investigar as alterações bioquímicas da estrutura da pele. A técnica alia as características de reflexão interna total da radiação em um cristal à fração de radiação absorvida ao passar pela amostra. Na técnica de ATR a onda se propaga e atinge o cristal em um ângulo crítico, permitindo múltiplos espalhamentos no seu interior. Parte da onda que reflete no interior do cristal, emerge dele na forma de uma onda evanescente, a qual penetra na amostra em contato com o cristal, decaindo sua intensidade exponencialmente. A onda evanescente que atinge a amostra é refletida de volta para o cristal sendo refletida e direcionada para o espectrômetro. A energia da onda refletida baseia-se na vibração dos átomos de uma molécula. Um espectro no infravermelho é geralmente obtido pela passagem da radiação no infravermelho através de uma amostra e determinando qual a fração da radiação incidente é absorvida com uma energia particular. Os picos do espectro de absorção correspondem à frequência de vibração da molécula na região de análise da amostra.

A profundidade de penetração na amostra é tipicamente entre 0,5 e 2 μm , com o valor exato a ser determinado pelo comprimento de onda do feixe incidente, o ângulo de incidência e os índices de refração do cristal de ATR e do meio que está sendo investigado.

Assim como a espectroscopia no infravermelho nos fornece informações sobre os compostos bioquímicos, as técnicas de microscopia não-linear, nos permitem investigar por meio de imagem as transformações moleculares envolvidas na regeneração tecidual^{9,10}.

A técnica de microscopia de fluorescência por excitação de dois fótons (Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy ou TPEFM) e a técnica de geração de segundo harmônico (Second Harmonic Generation – SHG) são utilizadas para obter imagens de tecidos túrbidos e finos e também para imagens de amostras biológicas com estruturas altamente organizadas sem qualquer marcador exógeno. Como informação complementar detalhando estruturas de sistemas biológicos, o SHG é um processo coerente no qual fótons do feixe laser, passando através de uma estrutura não-linear geram outro fóton com duas vezes a frequência óptica, isto é, metade do comprimento de onda no meio, oposto ao efeito da fluorescência de dois fótons¹¹. A intensidade dos sinais gerada varia com a técnica. No SHG, a intensidade é altamente dependente do comprimento de onda de excitação, enquanto que na emissão de dois fótons é influenciado pelo comprimento de onda do laser e a absorbância espectral da estrutura estudada.

Os métodos ópticos descritos permitem caracterizar tecidos biológicos fornecendo, por exemplo, informações sobre a orientação do colágeno e de propriedades ópticas e mudanças vibracionais durante a evolução de processos cicatriciais.

1.2. A Pele – Anatomia e Função

A pele, também chamada de tegumento (do Latin *tegumentum* significa cobertura), possui importância para a termorregulação, a proteção, a função metabólica e a sensação. A anatomia da pele é complexa, possuindo muitas estruturas entre suas camadas (FIGURA 1). Sua espessura varia de 1,5 a 4,0 mm, dependendo da parte do corpo, e composta basicamente por duas camadas. Uma camada mais externa, a epiderme, revestida por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo

formado predominantemente por células diferenciadas de queratina ou queratinócitos; e a derme, que serve de apoio para o epitélio, a qual é um tecido conjuntivo fibroso formado por colágeno e elastina, dando força e elasticidade a pele. Abaixo da derme e em continuidade a esta, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, a qual não pertence a pele, porém compartilha alguma das suas funções de proteção, e serve como união aos órgãos subjacentes. A hipoderme é um tecido conjuntivo frouxo constituído principalmente de células adiposas.

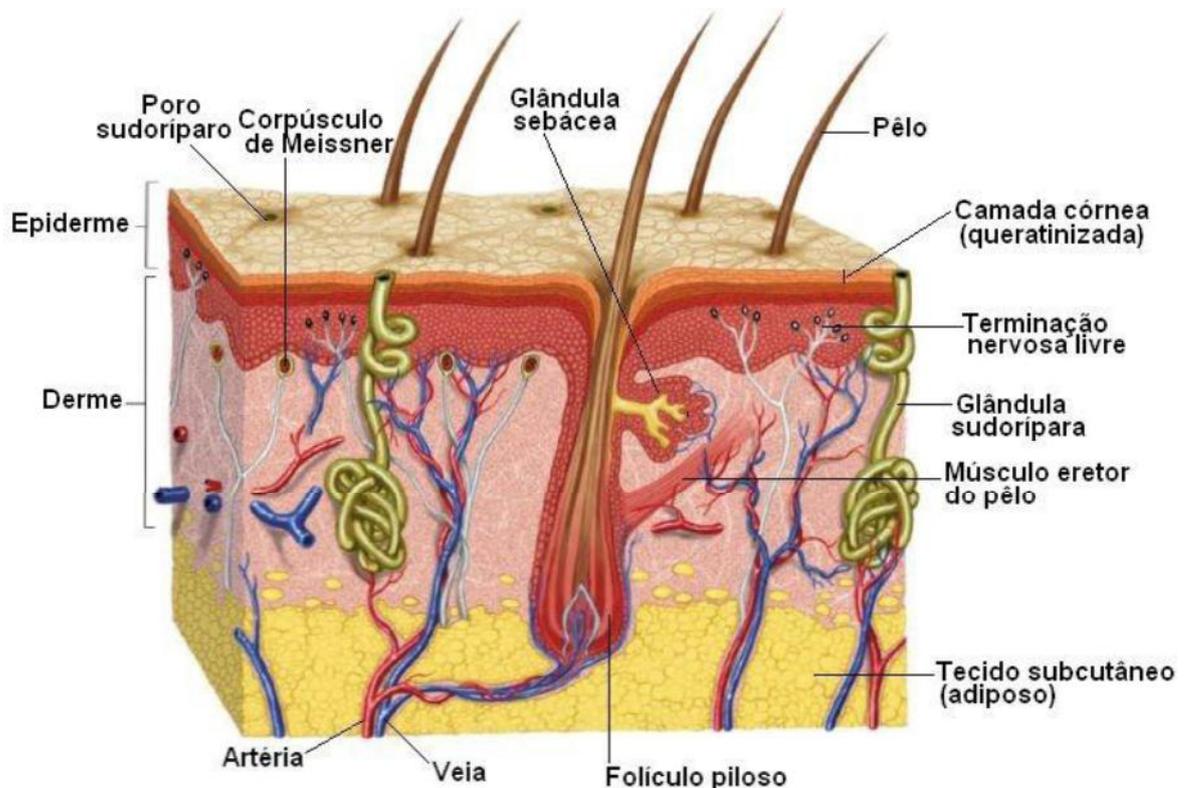


FIGURA 1 - Estrutura da pele e seus apêndices dérmicos.

1.2.1. Epiderme

É um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (FIGURA 2), que se assenta sobre o tecido conjuntivo, onde as células que estão próximas a lâmina basal (interface entre os tecidos), são chamadas de células basais e possuem formato poliédrico⁵⁶. Na epiderme o tecido epitelial possui contínua renovação celular por atividade mitótica, que ocorre na lâmina basal, proliferado pela atividade das células

tronco localizadas nesta região. Após a mitose, as células que estão em trânsito celular, saem do ciclo e migram da lâmina basal em direção a camada suprabasal, diferenciando-se e alterando sua forma até alcançarem a superfície da epiderme tornando-se achatadas, terminalmente diferenciadas, de onde serão removidas para o ambiente externo. Os queratinócitos são as células mais abundantes na epiderme, além deles existem as células de Langerhans, os melanócitos e as células de Merkel.

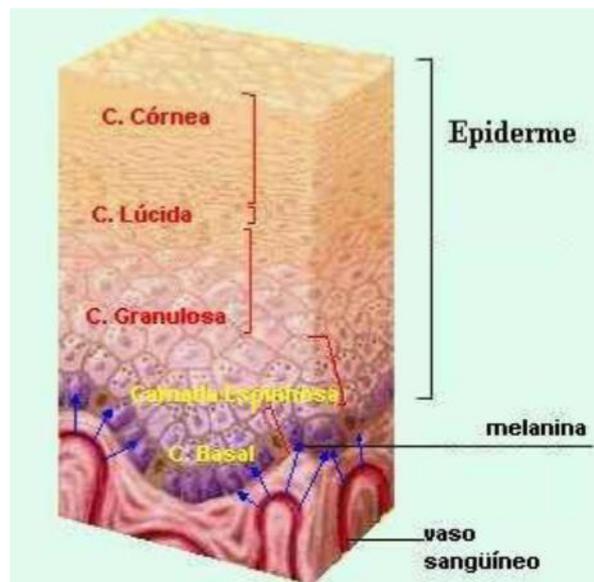


FIGURA 2 - Epiderme e suas camadas.

1.2.1.1. Camada basal

Formada por células prismáticas ou cubóides, basófilas, encontradas sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme (porção epitelial intermediária). Esta camada, por ser rica em células-tronco, também recebe o nome de germinativa. Apresenta intensa atividade de mitose, sendo responsável, juntamente com a camada seguinte (camada espinhosa), pela contínua renovação da epiderme. Estima-se que a epiderme dos humanos se renove a cada 15 a 30 dias, dependendo do local e idade da pessoa. As células desta camada possuem filamentos intermediários de queratina, que se tornam mais numerosos ao passo que a célula avança em direção à superfície.

1.2.1.2. Camada espinhosa

Compostas por células cuboides, ou levemente achatadas, com núcleo localizado centralmente, citoplasma com expansões citoplasmáticas se aproximam e se mantêm unidas com as células ao redor através dos desmossomos, dando às células um aspecto espinhoso. Existe também tonofilamentos que se inserem nos espessamentos citoplasmáticos dos desmossomos. Tanto o filamento de queratina quanto os desmossomos desempenham importante papel na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito. Nesta camada também estão presentes células tronco dos queratinócitos, sendo que as mitoses ocorrem na camada basal e, em menor quantidade, na camada espinhosa.

1.2.1.3. Camada granulosa

Possui apenas 3 a 5 fileiras de células poligonais achatadas, núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos, conhecidos como grânulos querato-hialina. Esses grânulos contêm uma proteína rica em histidina fosforilada e também proteínas contendo cistina. Através da microscopia eletrônica, podem ser visualizados os grânulos lamelares, que se fundem com a camada granulosa, onde há a deposição de um material lipídico, contribuindo para a formação de uma barreira contra a penetração de substâncias e torna a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo.

1.2.1.4. Camada lúcida

Esta camada é mais evidente na pele espessa e formada por uma fina camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, cujos núcleos e organelas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e desapareceram. Estão presentes no citoplasma filamentos de queratina, compactados e envolvidos por material elétron-denso.

1.2.1.5. Camada córnea

Possui espessura muito variável e constituída por células achatadas, mortas e anucleadas. O citoplasma apresenta-se cheio de queratina. Esta possui, no mínimo, seis polipeptídeos distintos. As células da camada basal apresentam queratina de baixo peso molecular, enquanto os queratinócitos mais diferenciados sintetizam queratinas de peso molecular maior. Na camada córnea os tonofilamentos se aglutinam juntamente com a

matriz formada pelos grânulos de querato-hialina. Nesta fase, os queratinócitos estão transformados em placas sem vida descamando continuamente.

1.2.2. Derme

A derme é um tecido conjuntivo separado da epiderme pela membrana basal. Ela pode ser dividida em duas camadas distintas, a camada superficial, papilar; e na derme subjacente reticular (). A camada papilar inclui a derme papilar, como estruturas que penetram na epiderme. A derme é principalmente composta por colágeno e fibras de elastina em uma matriz de polissacarídeo. A fração celular inclui fibroblastos, macrófagos, células dendríticas dérmicas e linfócitos. A derme também é rica em canais vasculares (vasos sanguíneos e vasos linfáticos) e fibras nervosas.

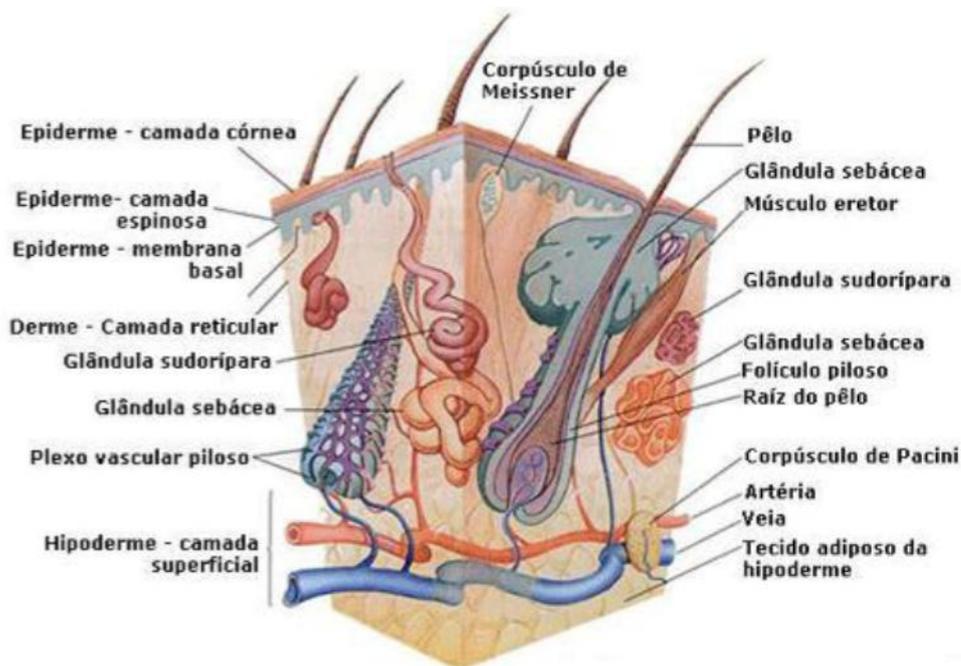


FIGURA 3 - Derme e suas estruturas.

1.3. Laser de Pulsos Ultracurtos

No processo de interação do laser de femtossegundos, de alta intensidade, em tecidos transparentes, geralmente envolve uma quantidade de processos físicos: ionização, propagação e refração, geração de ondas de plasma, e a subsequente alteração térmica e hidrodinâmica do tecido. A importância desses processos físicos de interação depende dos parâmetros do laser de femtossegundos.

Em um tecido transparente, a absorção dos fótons do laser de femtossegundos é significativamente não-linear. Por esse processo, a alta intensidade do laser causa nos elétrons a promoção da banda de valência para a banda de condução, depositando energia do laser no material. Existem dois tipos de mecanismo de excitação, envolvidos nessa absorção: a fotoionização e a ionização avalanche.¹² No processo de absorção, há a formação de plasma a qual também afeta a propagação do laser no tecido.

A fotoionização é a excitação de um elétron pelo laser. Nesse processo múltiplos fótons são necessários para excitar o elétron da banda de valência para a banda de condução. Dependendo da frequência e intensidade do laser há dois tipos de regime de fotoionização: a ionização multifóton e a ionização por tunelamento. Para altas intensidades ($> 10^{13}$ W/cm²), do laser a ionização multifóton é dominante. Ela é descrita, basicamente como a absorção simultânea de vários fótons por um elétron (FIGURA 4). O elétron deve absorver fótons suficientes para que o número de fótons absorvido vezes a energia de um fóton, seja maior que a energia da banda de *gap* do material.

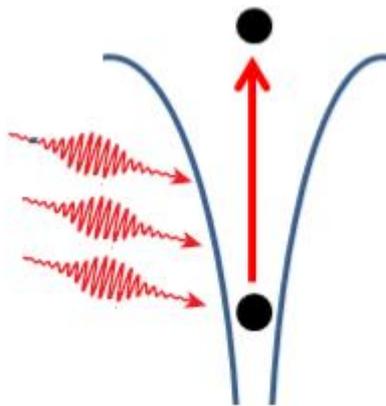


FIGURA 4 - Diagrama da ionização multifóton no potencial atômico.

Para lasers com intensidade acima de 10^{15} W/cm² e baixa frequência, a fotoionização está sob regime da ionização por tunelamento. Nesse tipo de ionização o campo elétrico do laser suprime o potencial coulombiano que liga o elétron a banda de valência, dessa forma o elétron tunela através da barreira de potencial mais estreita tornando-se livre.

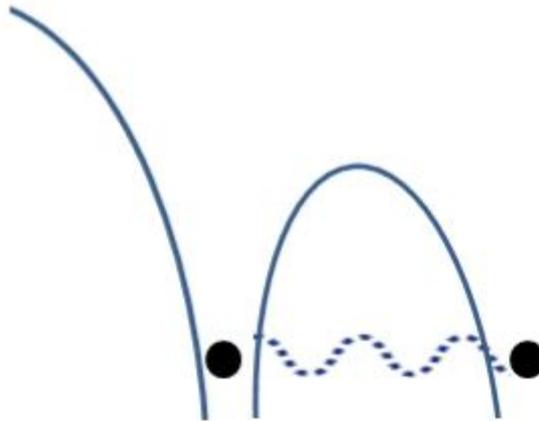


FIGURA 5 - Fotoionização por tunelamento.

A taxa de fotoionização depende diretamente da intensidade do laser. Na ionização multifóton, a taxa é expressa como $P(I) = \sigma_k I^k$, onde σ_k é o coeficiente de absorção para k fótons absorvidos¹³. O número de fótons envolvidos no processo é determinado por $k\hbar\omega \geq E_g$, onde \hbar (h cortado) é um símbolo simplificado para $\hbar \equiv h/2\pi$, sendo h a constante de Planck; ω é frequência do laser, e E_g energia da banda de gap do material. A taxa de tunelamento é menor com a intensidade do laser que a ionização multifóton.

A ionização avalanche é produzida quando elétrons livres absorvem fótons de energia transferindo parte dessa energia para a ligação, ocasionando a ionização por impacto¹⁴. Consequentemente os elétrons livres absorvem mais fótons, produzindo mais elétrons livres na banda de condução. A esse processo de formação de portadores de cargas livres pelo impacto, denomina-se ionização avalanche, onde a densidade de elétrons aumenta exponencialmente. A ionização avalanche depende da densidade de elétrons livres e linearmente da intensidade do laser¹⁵.

A nuvem de plasma de elétrons formada pela fotoionização e ionização avalanche pode absorver a energia do laser, quando a densidade do plasma torna-se alta. Se a densidade do plasma atingir um valor crítico ocorre a ablação. O valor crítico ou a densidade crítica é definida como o valor no qual a densidade de elétrons livres oscilando no plasma é igual a frequência do laser, relacionado através da equação:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m}}$$

onde N é o número de elétrons, e a carga do elétron, ϵ_0 permissividade elétrica no vácuo, e m a massa do elétron.

A causa direta da alta absorção pelo plasma do laser de femtossegundos é a desfocalização do pulso devido a contribuição negativa dos elétrons livres no índice de refração¹⁶. Quando a densidade de plasma atinge $10^{17} - 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ a contribuição é negativa para o índice de refração, devido a variação de portadores presentes no plasma.

A quantidade de energia absorvida pelo material pelos processos não lineares de absorção e a consequente remoção deste, são ligados a duração do pulso do laser de femtossegundos.

Para pulsos de longa duração (décimos de picossegundos), ocorre transferência de energia dos elétrons excitados para a rede cristalina, na mesma ordem de duração do pulso (tempo de relaxação térmica). A energia transferida para a rede propaga-se no material por difusão térmica. Para a remoção de material usando pulsos de longa duração, a quantidade de elétrons livres é fundamental para a absorção da energia do laser. Outro fator que influencia na remoção de material é a quantidade de impurezas presentes na rede. Devido às impurezas na rede, uma quantidade adicional de elétrons contribui para o processo de avalanche, desta forma reduzindo o limiar de colapso óptico (ou limiar de ablação) do material em relação ao material puro. O processo de colapso óptico devido às impurezas torna o processo estatístico.

O processo de colapso óptico devido a pulsos curtos de duração menor que picossegundos, é mais simples que o de longa duração. Para pulsos curtos a absorção não-linear ocorre em escala de tempo menor que a transferência de energia para a rede, dividindo o processo de absorção e transferência térmica de energia. Como mais elétrons estarão excitados, maior será a avalanche de elétrons, até atingir a densidade crítica, melhorando a absorção da energia do feixe. Somente após a extinção do pulso é que a energia é transferida para a rede. Essa deposição de energia por choque, em escala de tempo menor que a relaxação térmica da rede, leva ao colapso óptico, resultando na remoção do material. Para pulsos de longa duração a fotoionização é dominante. Os

pulsos de curta duração são mais regulares e mais confinados que os pulsos de longa duração, uma vez que eles são determinísticos, isto é, não dependem das características do material, nem da presença ou não de impurezas.

1.4. Espectrometro no Infravermelho por Transformada de Fourier

Durante muitos anos, obtinham-se os espectros de infravermelho com o auxílio de um feixe de luz infravermelha passando através da amostra frequência por frequência. A radiação transmitida era varrida por dispersão na rede de difração (grade de difração) e com isso, o espectro era obtido pela rotação da rede de difração, onde as bandas de absorção eram detectadas e lançadas em gráficos das frequências em função das intensidades¹⁷. Atualmente, todos os instrumentos comerciais para medições na região do infravermelho médio, vendidos para aplicações analíticas, são baseados em medições interferométricas sendo por isso classificados como instrumentos para o infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Atualmente, provavelmente não há mais do que 5% de instrumentos por dispersão sendo utilizados em serviços de análises na região do infravermelho médio.

1.5. Interferômetro de Michelson

O monocromador é o principal componente do espectrômetro por dispersão, e o mesmo se aplica no caso de instrumentos com transformada de Fourier (FT). O feixe de radiação a partir da fonte é separado por um divisor de feixes ("beamsplitter") semi transparente, em dois feixes parciais que são retidos, um através de um espelho fixo e outro através de um espelho móvel; tais feixes retornam ao divisor de feixes onde são recombinados, causando a interferência (FIGURA 6). A fração diretamente retornada para a fonte não é utilizada, sendo, portanto, perdida. O deslocamento do espelho móvel faz com que o caminho óptico mude no interferômetro, fazendo desta forma que a diferença de fase entre os feixes parciais resultem em mudanças na amplitude da interferência. A intensidade do sinal a partir do detector é uma função das mudanças do caminho óptico corrigida por uma componente constante, denominada interferograma¹⁸.

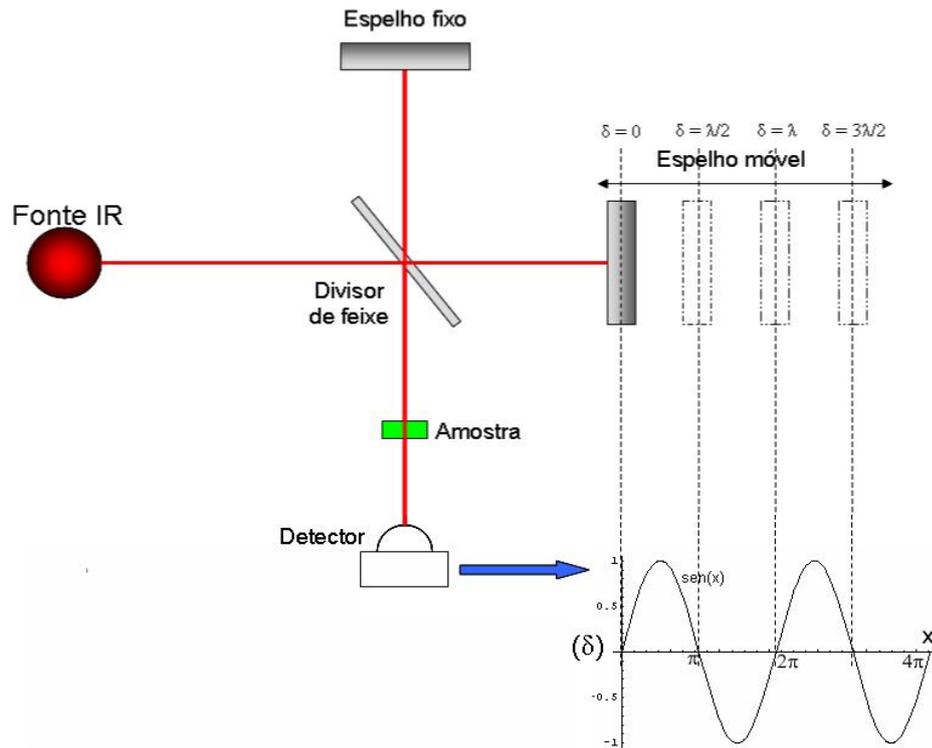


FIGURA 6 - Imagem esquemática de um arranjo FTIR que é baseado no interferômetro de Michelson.

Para uma fonte de radiação monocromática, com comprimento de onda ou número de onda, dado por um laser, o cosseno do sinal (intensidade parcial da intensidade do feixe) é obtida no detector com sendo função da diferença de caminho, a qual é denominada retardo:

$$I(x) = I_0[1 + \cos(2\pi\nu C_0)]: \quad \text{Equação 2}$$

Com o mesmo caminho óptico em ambos os lados do interferômetro, não há diferença de fase entre os dois feixes parciais, os quais podem interferir construtivamente, ou seja, ambos os picos de ondas elétricas são adicionados. Se o espelho móvel se deslocar $\lambda/4$, haverá um retardo entre os feixes parciais de exatamente $\lambda/2$ e uma diminuição da interferência no detector. Para fontes de radiação com vários comprimentos de onda, a interferência padrão corresponde à soma dos cossenos dos sinais de cada frequência individual. Os interferogramas simétricos obtidos podem ser convertidos em um espectro através da transformada de Fourier. O resultado é igualmente uma função simétrica para a qual os dados espectrais são

duplicados, espelhados no ponto zero. A transformação reversa é possível sem que haja perda de informação. Na maioria dos casos, o interferograma obtido experimentalmente é assimétrico, com relação aos vários deslocamentos de fase nos vários comprimentos de onda, resultante de efeitos ópticos e eletrônicos; devido a isso, uma transformada de Fourier mais complexa é necessária, como por exemplo a inclusão de termos relativos ao seno.

Por razões técnicas, o interferograma não é obtido continuamente e sim, ponto a ponto. Devido a este fato, o padrão de interferência de uma luz monocromática, isto é, o laser de He-Ne é simultaneamente detectado através de um diodo detector. O cruzamento do zero, do seno do sinal do laser de referência ou valores múltiplos deste intervalo.

1.6. ATR-FTIR

A reflectância total atenuada (ATR) é hoje a ferramenta de amostragem mais utilizada. O ATR geralmente permite análises qualitativa ou quantitativas de amostras com pouca ou nenhuma preparação o que aumenta significativamente a velocidade de análise da amostra. A principal vantagem da amostragem ATR vem do comprimento muito fino de amostragem e profundidade de caminho de penetração do feixe de infravermelho na amostra. Isto está em contraste para amostragem do FTIR tradicional de transmissão por onde a amostra deve ser diluída com sal transparente ao infravermelho, prensada em uma pastilha ou pressionado para uma película fina, antes da análise para impedir totalmente absorvente banda sem o espectro de infravermelho. Na espectroscopia de transmissão, o feixe de IR passa através da amostra e do comprimento efetivo do percurso é determinada pela espessura da amostra e da sua orientação em relação a direção de plano do feixe de IR.

A consideração útil para a análise ATR é a profundidade da penetração do feixe de IR na amostra. Tecnicamente, isso é definida como a distância necessária para a amplitude do campo elétrico cair para e^{-1} do seu valor na superfície e é ainda definido por:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

Equação 3

onde λ é o comprimento de onda da luz, θ é o ângulo de incidência relativa do feixe de IR para uma perpendicular a partir da superfície do cristal¹⁹, e n_1 e n_2 são os índices de refração do cristal e da amostra, respectivamente. (FIGURA 7).

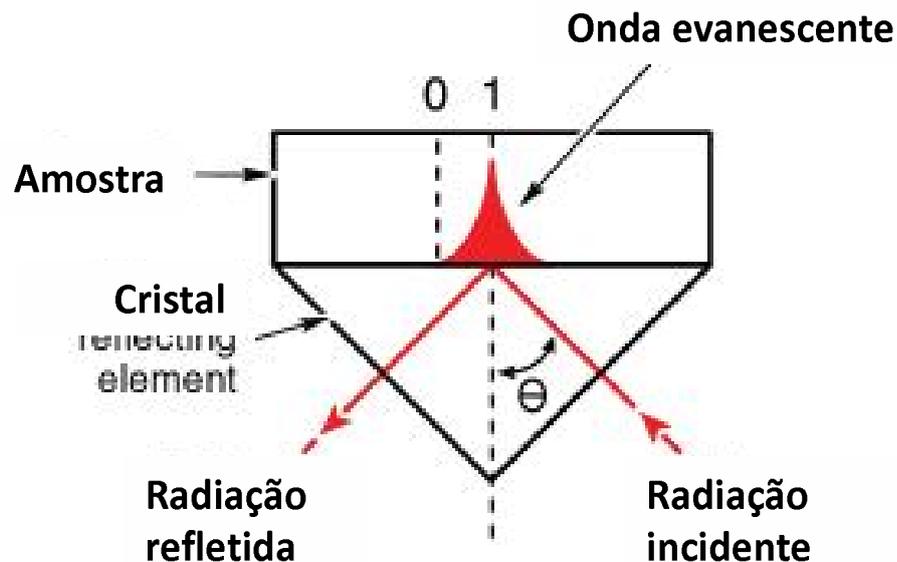


FIGURA 7 - Representação da profundidade de penetração da onda evanescente na amostra.

A profundidade típica de penetração varia de 0,5 μm até 5 μm , dependendo dos valores experimentais. A intensidade da onda evanescente decai rapidamente a partir da superfície do cristal ATR. Se quisermos comparar a absorbância da amostra de medição no ATR com de uma medição de transmissão, é necessário calcular o volume da onda evanescente, conhecida como a penetração eficaz do feixe de IR. A penetração eficaz, é única para polarização paralela e polarização perpendicular.

1.7. Microscopia Não-Linear

1.7.1. Second Harmonic Generation - SHG

Conversão de harmônico molecular origina-se da dependência não-linear da molécula induzida de momento de dipolo m sobre o campo elétrico aplicado que pode ser expresso como uma série de potências em E (FIGURA 8)²⁰.

$$P = \epsilon_0 [\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots]$$

$$= [P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots]$$

Equação 4

onde ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo, $\chi^{(n)}$ é a susceptibilidade não-linear de ordem n , e $P^{(n)}$ é a polarização não-linear de ordem n . A dependência espacial e temporal do campo elétrico foram suprimidas para efeito de simplificação da equação. Cada campo elétrico do lado direito da equação pode ter diferentes componentes de frequência, os quais produzirão polarizações não-lineares como soma e/ou diferença desses componentes de frequência. Para polarizações de segunda ordem, poderíamos ter dois campos, E_1 e E_2 , com frequências ω_1 e ω_2 , respectivamente. Considerando o meio como isotrópico, isto é $\chi^{(2)}$ é um escalar, as componentes da frequência para os processos de microscopia não-lineares são dados por:

$$P^{(2)}(2\omega_1) \approx \chi^{(2)} E_1^2$$

Equação 5

$$P^{(2)}(2\omega_2) \approx \chi^{(2)} E_2^2$$

Equação 6

$$P^{(2)}(\omega_1 + \omega_2) \approx 2\chi^{(2)} E_1 E_2$$

Equação 7

A **Equação 5** e **Equação 6** descrevem a geração de segundo harmônico para o campo elétrico incidente. A **Equação 7**, descreve a soma das frequências que rege o processo TPEFM.

Esforços consideráveis têm sido feitas para moléculas com grandes hiperpolarizabilidades não-lineares²¹. No entanto, aqui, nos concentramos em moléculas biológicas endógenas, tais como colágeno. Como caso especial, mas realista, vamos supor que a molécula seja uni-axial, o que significa que sua hiperpolarizabilidade de tensor é dominada por um único componente e que o seu alinhamento é paralelo ao campo de polarização de condução. Podemos definir o SHG na mesma seção transversal com as correspondentes seções transversais da TPEFM na mesma ordem. Este parâmetro diretamente fornece o poder de espalhamento multi-harmônico, sendo ω a frequência de oscilação da radiação, a partir de uma única molécula para uma dada intensidade do campo.

Na prática, SHG é geralmente muito menor do que TPEFM para uma única molécula. Para uma molécula excitada perto de sua ressonância, no entanto, é possível melhorar o sinal de SHG, em até 2 ordens de magnitude. Contudo, SHG aumenta de forma quadrática com N, enquanto que a fluorescência aumenta apenas linearmente com N. O sinal de SHG emitido é geralmente anisotrópico devido as restrições de espalhamento coerente em fase correspondente. Quando o tamanho, s , dos centros de espalhamento, ao longo do eixo óptico, é $s \gg \lambda_{inc}$, SHG é predominantemente transmitido. O processo de geração de segundo harmônico é um processo de dispersão não-linear coerente que conserva a energia, e, portanto, o comprimento de onda SHG é sempre metade do comprimento de onda incidente.

O sinal de SHG coletado no modo de reflectância é relativamente mais baixo que o transmitido. Devido o SHG ser um processo coerente e as ondas de segundo harmônico majoritariamente propagarem com o feixe de excitação, é necessário compreender a origem do sinal de SHG refletido da amostra. Três fontes principais contribuem para a formação dos sinais refletidos. Em primeiro lugar, os sinais refletidos são emitidos a partir do colágeno fibrilar da derme. O sinal SHG emitido é geralmente anisotrópico, porque a fase correspondente possui espalhamento coerente. Em segundo lugar, devido a opacidade da derme humana, os sinais refletidos de SHG podem ser atribuídos ao retroespalhamento dos sinais gerados pela transmissão do sinal SHG. Em terceiro lugar, o retroespalhamento dos fótons excitados balísticamente pela luz de excitação induz sinais de SHG transmitidos, isto são, os sinais refletidos. A existência de sinal de SHG refletido é muito útil para imagem *in vivo* de tecidos porque a coleta de sinais transmitidos de propagação é impraticável em muitos casos²².

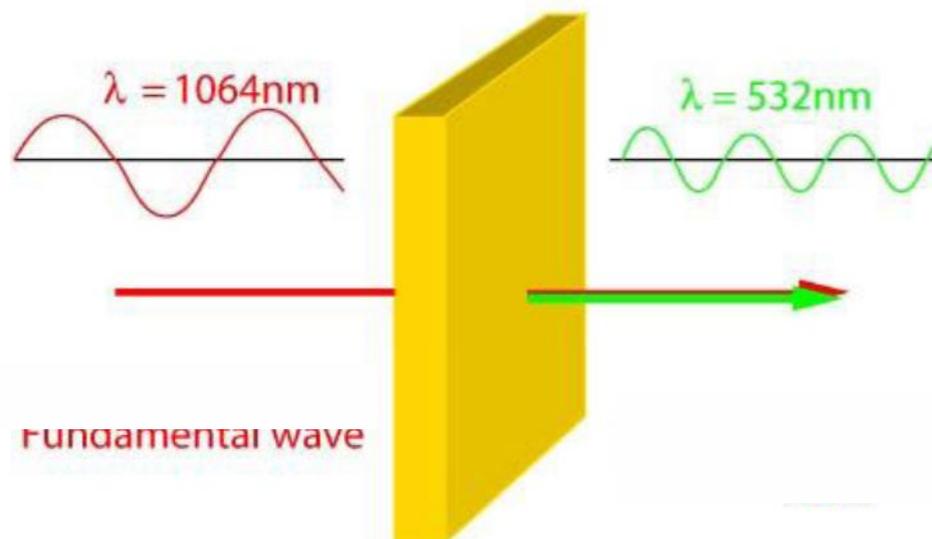


FIGURA 8 - Diagrama representativo da geração de segundo harmônico em um material que não possui centro de simetria.

1.7.2. Microscopia de Fluorescência por Excitação de Dois Fótons – TPEFM

A microscopia convencional de fluorescência por excitação de um fóton faz uso de um fóton de UV ou visível que é capaz de combinar com o *gap* de energia entre o estado fundamental e o estado excitado²³. A excitação da molécula por dois fótons é um processo não-linear relacionado com a absorção simultânea de dois fótons, tipicamente IR, cuja energia total é suficiente para produzir uma transição molecular para um estado excitado eletronicamente (FIGURA 9). Em geral, pode-se usar fótons de comprimentos de onda λ_1 e λ_2

$$\lambda_{1II}^{-1} = (1/\lambda_1 + 1/\lambda_2) \quad \text{Equação 8}$$

onde λ_{1P} é o comprimento de onda necessário para a emissão de fluorescência privilegiada na absorção de um fóton. Por razões práticas $\lambda_1 = \lambda_2$ e a escolha experimental inicial é $\lambda_1 \approx 2\lambda_{1P}$.²⁴²⁵

A excitação por dois fótons de moléculas fluorescentes, proporciona uma vantagem prática imediata sobre microscopia confocal pois não causa fotoclareamento na amostra, não exigindo marcadores exógenos.

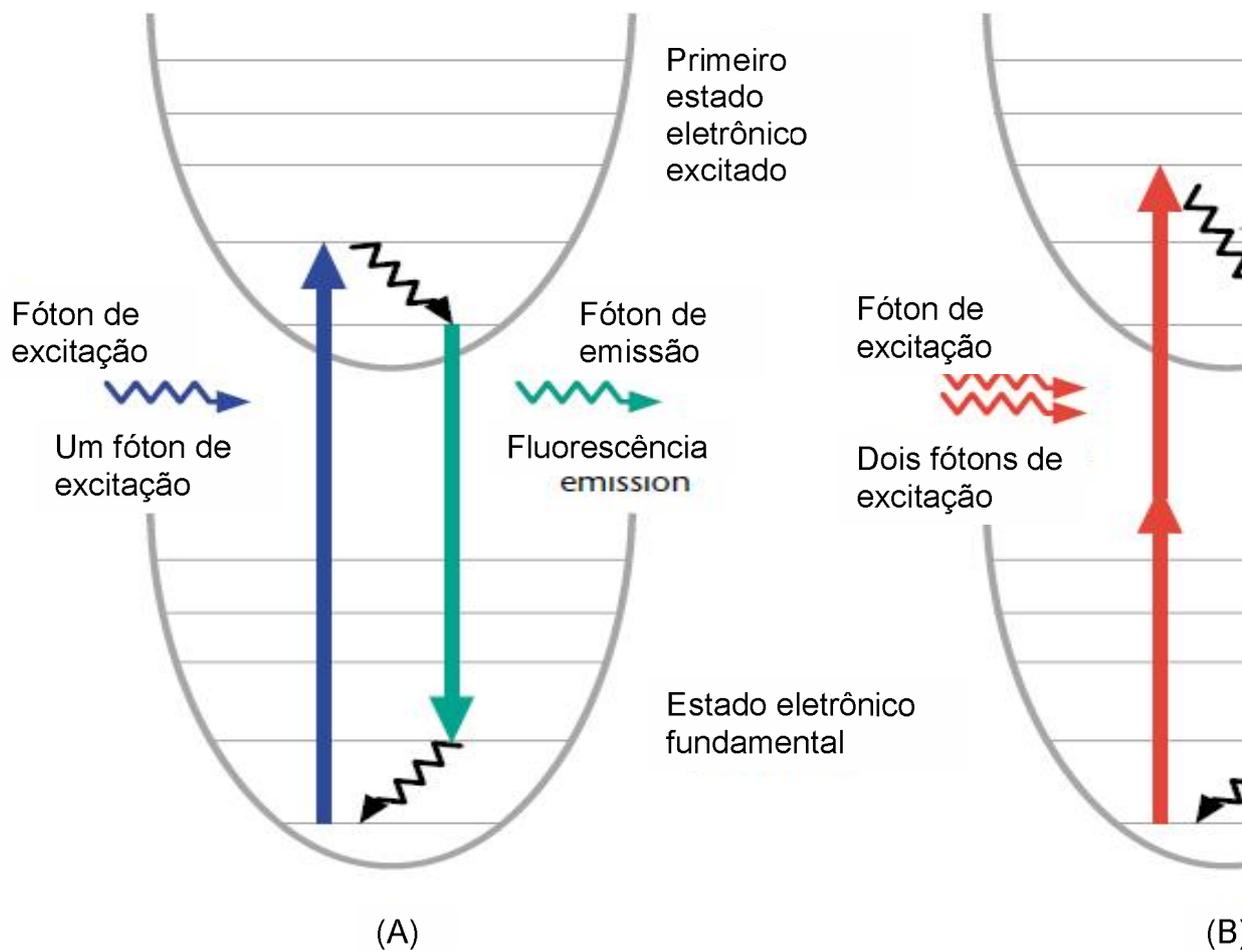


FIGURA 9 - Diagrama de Jablonski para (A) excitação por um fóton e (B) excitação por dois fótons.

1.8. Tomografia por Coerência Óptica - OCT

A técnica de tomografia por coerência óptica (OCT), é uma técnica não-invasiva de imagem de tecidos biológicos e materiais²⁶. Inicialmente, foi uma técnica de diagnóstico de aplicação clínica na oftalmologia²⁷. Desde então, a instrumentação do OCT passou por uma melhoria substancial e agora esta bem posicionado para a ampla adoção em várias outras aplicações clínicas e de pesquisa²⁸. Por exemplo, esta tecnologia tem sido ativamente utilizada em outras aplicações clínicas, como cardiologia²⁹, oncologia³⁰, a visualização da estrutura dental³¹

Embora o OCT proporcione muitas vantagens na medicina, a profundidade de penetração é baixa e esta é uma limitação para outras aplicações. Uma vez que as

propriedades ópticas de tecido dependam do comprimento de onda usado, é necessário escolher o comprimento de onda adequado para maximizar a penetração de luz e melhorar o contraste da imagem em profundidades.

Na faixa do comprimento de onda no infravermelho, as primeiras aplicações clínicas do OCT para oftalmologia normalmente usavam 800 nm. Recentemente, a faixa comprimento de onda em torno de 1700 nm tem sido atrativa para a aquisição de imagens de tomografia óptica. Nessa faixa, a profundidade de penetração na pele é otimizada.

A técnica de OCT reconstrói o perfil de retro-espalhamento óptico em profundidade de 1 a 3 mm para a maioria dos tecidos biológicos, pois devido ao coeficiente de espalhamento, coeficiente de absorção e suas dependências com o comprimento de onda, a quantidade de luz retroespalhada deste tecido pode ser insuficiente para detectar estruturas em profundidades maiores que as descritas^{34,32}.

São utilizados como fonte de luz, vários tipos de lasers, em particular o laser de Titânio-Safira, assim como LEDs Superluminescentes³³. A luz emitida atravessa um elemento óptico que divide o feixe em dois caminhos ópticos, sendo um direcionado para o espelho do braço de referência do interferômetro do aparelho e o outro para a amostra. A luz refletida do espelho presente no braço de referência e a luz retroespalhada da amostra são recombinadas no divisor de feixe, ocorrendo interferência entre elas. A intensidade do feixe recombinante é mensurada por um detector óptico, permitindo obter informações oriundas de diferentes profundidades do tecido em estudo (FIGURA 10)^{34,35}. Os sinais de intensidade captados pelo detector são transmitidos a um computador, onde são analisados.

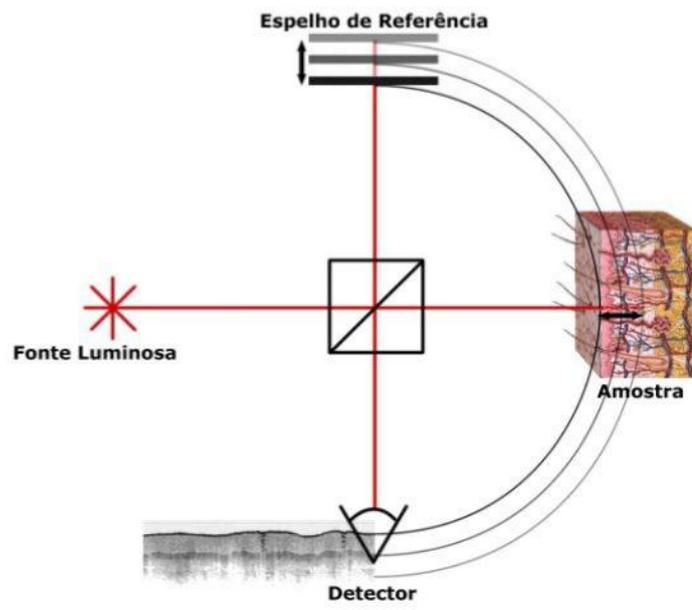


FIGURA 10 - Ilustração esquemática de um arranjo OCT³⁵

2. Objetivo

2.1. Geral

O objetivo principal deste estudo é avaliar a viabilidade de utilizar lasers de femtossegundos de altíssima intensidade como coadjuvante no tratamento de pacientes queimados por meio de um modelo *in vivo*.

2.2. Específico

Remover *in vivo* por laser de altíssima intensidade e pulsos ultra-curtos, tecidos necrosados por queimadura de terceiro grau em pele de ratos da raça Wistar, **acompanhar** e **caracterizar** o processo de cicatrização por quatro métodos:

- **Invasivos:** por análise histológica de biopsias dos tecidos, por micro-espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e por microscopia não-linear;
- **Não-invasivo:** por Tomografia por Coerência Óptica.

3. Material e Métodos

3.1. Planejamento do estudo

O estudo foi realizado em três etapas: na primeira provocamos as queimaduras nos animais e aguardamos por um período de 3 dias, para a delimitação das queimaduras, ; na segunda, os animais queimados foram submetidos aos tratamentos de ablação laser e desbridamento cirúrgico; na terceira, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, conforme os dias de análise (3^o, 5^o, 7^o e 14^o), analisados por OCT, sacrificados para biópsia e posteriormente foi realizado o estudo pelas técnicas de histologia, μ ATR-FTIR e microscopia não-linear.

Para a realização da primeira etapa do experimento foram utilizados 25 ratos machos da raça Wistar, com massa de aproximadamente 300g. Os animais foram anestesiados com combinação de quetamina e xilazina em seguida foi feita tricotomia na região dorsal. A queimadura foi produzida por exposição a uma fonte de vapor de água (aproximadamente 90 °C), com diâmetro de 8 mm, em três pontos. A fim de delimitar as bordas da queimadura, aguardamos por três dias para os procedimentos de tratamento. Para a realização da segunda etapa, uma das regiões queimadas foi irradiada com laser de Titânio:Safira, e em outra foi feito o desbridamento a frio. A terceira região queimada foi deixada como controle no processo de regeneração. Antes de cada procedimento foi aplicado, sobre as lesões, solução aquosa de clorexidina 2% para desinfecção da área.

Na última etapa do estudo, os animais queimados foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com 5 animais em cada grupo, e definido conforme o dia do sacrifício: 3^o dia, 5^o dia, 7^o dia e 14^o dia (Tabela 1). Cada grupo foi analisado por OCT, histologia, micro-espectroscopia no infravermelho e microscopia não-linear (FIGURA 11).

Tabela 1 – Distribuição de animais/grupo e as técnicas de caracterização

Dia (Grupo)	Nº de Animais	Controle	Irradiado	Desbridado
3	5	OCT/ Histologia/ μ ATR-FTIR/	OCT/ Histologia/ μ ATR-FTIR/	OCT/ Histologia/ μ ATR-FTIR/
5	5	Microscopia Não-	Microscopia Não-	Microscopia Não-

7	5	Linear	Linear	Linear
14	5			

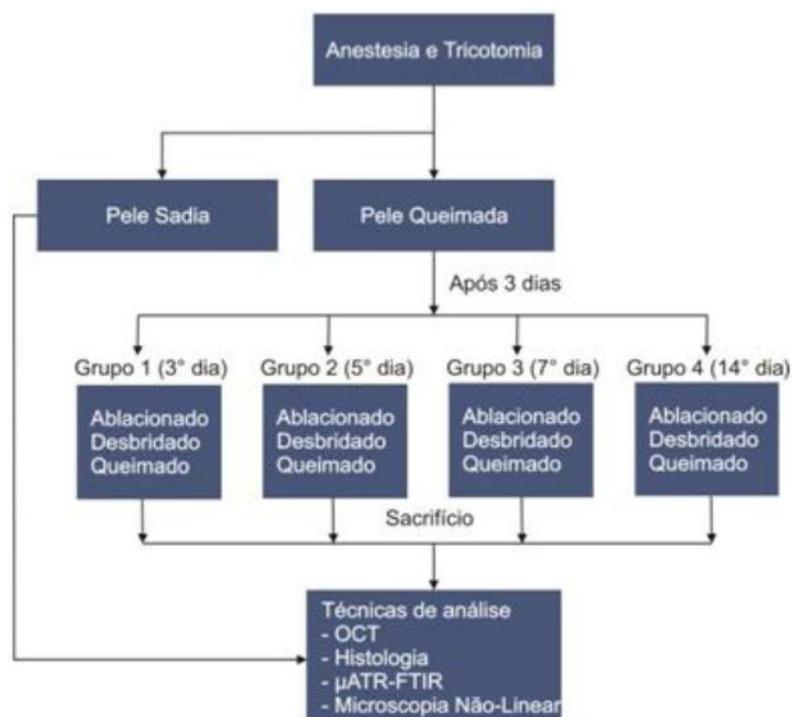


FIGURA 11 – Delineamento experimental das fases do estudo: geração da lesão, tratamento e análise.

3.2. Animais

Os procedimentos adotados neste projeto estão de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais (Lei n.º 6638, de 08 de maio de 1979) e com os princípios éticos da experimentação animal.

Adaptando a metodologia de geração de queimadura aos métodos usados por Bayat e colaboradores³⁶, utilizamos ratos da raça Wistar, machos e adultos. Todos os ratos foram alojados e alimentados adequadamente no Biotério do IPEN em gaiolas individuais, em condições controladas de temperatura e em regime de luz de 12h/12h. Durante todo o experimento, receberam água e ração sólida *ad libitum*. Na execução do projeto todos os ratos foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação anestésica de cloridrato de quetamina (0,32 mL/Kg) e xilazina (0,2 mL/Kg), e na região distal do dorso foi submetida à tricotomia seguida de anti-sepsia. No dia zero, foram provocadas três queimaduras de terceiro grau com 8 mm de diâmetro por exposição, durante 20 segundos, a uma fonte de vapor confeccionada com uma cânula de borracha acoplada

para a saída do vapor(FIGURA 12). A análise histológica foi utilizada para confirmar se houve queimadura de terceiro grau ou de espessura total envolvendo necrose total da epiderme e da derme dos ratos.

Este projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.



FIGURA 12 - Montagem da fonte de vapor para realização de lesão térmica nos animais.

3.3. Análises

3.3.1. Tomografia por coerência óptica (OCT)

O objetivo do OCT foi para avaliar quantitativamente a lesão em sua profundidade, a microestrutura do tecido e a propriedade de atenuação óptica total do tecido, utilizamos o método de OCT no domínio da frequência.

O sistema OCT utilizado neste estudo (OCP930SR, Thorlabs Inc., USA), possui fonte de LED superluminescente, com comprimento de onda central de 930 nm, largura de banda de 100 nm, e resolução axial e lateral no ar de 6,0 μm (8 quadros por segundo). As imagens geradas tem 1 Mpixel (2000 x 512), correspondendo a um alcance lateral de 6,0 mm e uma profundidade axial de 1,5 mm no ar.

3.3.1.1. Análise dos dados

Foram adquiridas imagens das regiões das lesões logo após os tratamentos e seus perfis de atenuação foram obtidos e analisados em três etapas. Na primeira, foram estudados os perfis de atenuação da luz na amostra, sendo esses perfis obtidos através de aplicativo desenvolvido em LabView (National Instruments, Texas, USA).

A partir das imagens de OCT, escolhemos a região de interesse para estudo com comprimento lateral de 1,5 μm . Escolhida a região, obtivemos o perfil de atenuação total no interior do tecido e exportamos os dados para posterior análise com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

Na etapa seguinte, os perfis de atenuação total foram estudados. Primeiramente delimitamos a região da derme no perfil de atenuação; a seguir, ajustamos o trecho delimitado da curva de acordo com a amplitude do sinal que retorna da amostra, dado em dB, por:

$$10 \log \left(\frac{P(z)}{P_0} \right) \approx -20\mu_t \log ez + 10 \exp(K\mu_b A(z)) \quad \text{Equação 9}$$

onde P_0 é a potência da onda incidente na superfície da amostra; $P(z)$ é a potência retroespalhada retornando de uma profundidade z do tecido; K é uma constante que depende da função de coerência da fonte; $A(z)$ é a função de divergência do feixe; e μ_b e μ_t são o coeficiente de espalhamento e atenuação total, respectivamente. Por simplificação, aproximamos a

Equação 9, a equação de uma reta, dada por:

$$y = a + bx \quad \text{Equação 10}$$

onde: a , representa o coeficiente de atenuação total da amostra.

Obtidos os coeficientes de atenuação total, calculamos a média aritmética dos coeficientes de cada uma das amostras.

Obtidos os coeficientes dos perfis de atenuação total de cada amostra, foram calculadas razões entre tais coeficientes. As razões consideradas tomaram como referência o coeficiente de atenuação total da pele sadia, dessa forma, as razões foram:

queimada/sadia, debridada/sadia e irradiada/sadia. Através da análise das razões, buscou-se obter um coeficiente de atenuação relativo que caracterizasse o processo de regeneração do tecido de acordo com os tratamentos.

3.3.2. Histologia

Para a análise histológica, os animais foram sacrificados aleatoriamente com doses letais de anestésicos nos dias 3, 5, 7 e 14, para obtenção de amostras. Botões de pele foram cuidadosamente removidos por intermédio de bisturi, de tal forma que envolvessem parte da pele sadia adjacente à borda da ferida e o tecido lesionado em sua profundidade. As amostras foram fixadas em *Methacarn* (metanol + solução de Carnoy), e mantidas por um período máximo de 3h, conforme protocolo. Em seguida receberam o trâmite laboratorial de rotina. Os cortes histológicos foram efetuados transversalmente, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscópio de luz (Leica DMLP, Alemanha).

3.3.3. Microscopia Não-Linear

As amostras foram obtidas conforme foi descrito na seção 3.3.2. Para o estudo, as amostras foram crio-preservadas e cortadas perpendicularmente à epiderme, usando criótomo, compreendendo uma seção transversal das camadas da epiderme e derme na espessura de 20 μm e montadas em lâminas histológicas e cobertas com lamínula para a aquisição das imagens. As imagens obtidas pelas técnicas de autofluorescência e geração de segundo harmônico não possuíam marcadores exógenos das células.

Os cortes montados em lâminas histológicas foram examinados no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC), da Universidade Estadual de Campinas, usando confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axi Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Germany), usando as objetivas com aumento de 10x e 40x. As imagens foram coletadas usando laser NLO – Mai Tai com comprimento de onda centrado aproximadamente em 950 nm para excitação e filtros de emissão passa banda de 520 nm a 560 nm para a autofluorescência refletida e transmitida e um filtro passa baixa de 485 nm para detecção de SHG refletido e transmitido, com pinhole ajustado para 1 airy unit em cada canal, formato da imagem de 1024x1024 e zoom óptico de 1x. Os Z-

stacks foram adquiridos com intervalo de 6,30 μ s. O INFABIC é co-financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo: 08/57906-3) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo: 573913/2008-0).

3.3.3.1. Análise dos dados

As imagens de SHG foram analisadas pela função de *Fast Fourier Transform* - FFT, do software ImageJ 1.45s (National Institutes of Health - USA). Para a análise, escolhemos uma região de interesse na imagem, utilizando a ferramenta de seleção retangular, na qual continha a máxima quantidade de fibras de colágeno. Escolhido a região, aplicamos a FFT e geramos uma imagem que consiste de uma elipse e medimos a maior e menor distância na imagem (FIGURA 13)

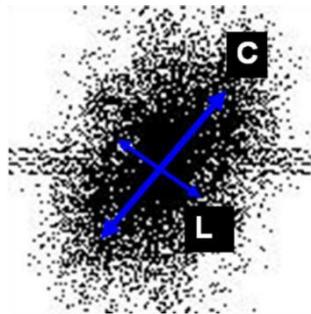


FIGURA 13 - Estimativa da orientação do feixe de colágeno pela razão da largura (L) pelo comprimento (C) da transformada de Fourier aplicada à região de interesse da imagem..

A orientação do colágeno foi calculada pela Equação 11:

$$coi = 1 - \left(\frac{L}{C} \right) \quad \text{Equação 11}$$

onde L é a largura, e C o comprimento da elipse. O índice de orientação do colágeno varia de 0 a 1. Para fibras de colágeno com orientação paralela, o índice tende a 1. Nas fibras de colágeno que estão aleatoriamente orientadas, o índice de orientação tende a zero^{37,38}

Uma vez que calculamos os índices de orientação do colágeno, calculamos a média aritmética de cada uma das amostras (queimada, desbridada e irradiada). Para identificação das semelhanças e diferenças entre os grupos.

3.3.4. Espectroscopia por μ ATR-FTIR

Os espectros foram obtidos usando o espectrômetro FTIR (modelo 6700, Nicolet Instruments, USA), equipado com acessório de micro ATR, com objetiva montada com cristal de Diamante, índice de refração 2,41 e ângulo de incidência de 45°. A metodologia escolhida para a realização dos experimentos foi a utilização de um passo de 6 cm^{-1} . e com 64 repetições, faixa de aquisição de 4000 a 800 cm^{-1} .

3.3.4.1. Análise dos dados

Para cada amostra de tecido foram replicados três amostras e os espectros adquiridos foram analisados em três etapas. Na primeira, foram estudadas as áreas referentes a cada uma das bandas de absorção. Para este estudo utilizamos o programa Microcal Origin 8 e sua ferramenta de análise para espectroscopia. Todos os espectros foram normalizados pela intensidade da banda situada em 1650 cm^{-1} (referente à Amida I), uma vez que ao adquirirmos os espectros a intensidade de contato do cristal com a amostra não possuía um controle e a espessura do corte apesar de feita em criótomo regulado, poderia possuir variações na sua espessura. Visto que visamos determinar os compostos orgânicos presentes nos tecidos, faz-se necessário uma normalização dos espectros obtidos.

Feita a normalização e integração das bandas de interesse, calculamos a média aritmética das áreas das bandas de cada uma das amostras.

A terceira e última análise dos espectros foi a análise das razões entre as bandas. Para o estudo, adotamos uma banda de absorção como referência para cada composto bioquímico: as variações associadas às proteínas, localizadas na região de análise das bandas em 1650 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} e 1245 cm^{-1} ; e a região do OH⁻ pela banda em 3300 cm^{-1} .

As proteínas consistem de uma série de bandas de absorção as quais compreendem as amidas I, amida II e amida III; a banda de absorção da amida I e amida II são as duas maiores bandas da região da proteínas, e a amida III a mais deslocada no

espectro; e por último, a banda de absorção OH apresenta moléculas de água associadas a esta banda.

Definidas as bandas de absorção representativas para a caracterização da regeneração do tecido, calculamos as razões entre suas áreas. Consideramos as razões entre amida I/amida II, também conhecido como fator de hidratação; amida II/amida III; amida I/OH. Com as razões das bandas, buscou-se caracterizar o tecido queimado em regeneração.

3.4. Ablação laser

O sistema laser adotado para este estudo é baseado no método de amplificação de pulsos com varredura em frequência (*chirped pulse amplification* - CPA), de Titânio:Safira, do Laboratório de Lasers Compactos de Altíssima Potência do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), do IPEN.

Para avaliar a energia depositada por pulso e a profundidade alcançada no processo de remoção de *debris*, realizamos um estudo piloto no qual os *spots* foram focalizados sobre uma amostra de pele *ex-vivo*, de rato da raça Wistar, macho, removida com bisturi. A amostra foi fixada sobre uma placa de acrílico, e posicionada sobre uma mesa-xy com dois eixos coordenados, de acurácia micrométrica, por programação CNC (*Computer Numeric Control* ou Controle Numérico Computadorizado), do Laboratório de Aplicações Industriais de Lasers do CLA. A irradiação foi realizada perpendicularmente ao feixe, varrendo uma região de 1 x 2 mm, com sobreposição de pulsos de 25%, velocidade de deslocamento da amostra de 540 mm/min, e taxa de repetição do pulso de 2 kHz. Paralelo a saída do feixe, montamos o sistema OCT, para automatizar as medidas de profundidade na amostra e avaliar a qualidade das irradiações em tempo real. No estudo piloto, avaliamos 4 condições de energia: 5, 10, 20 e 50 μJ . Com a energia de 5 μJ em uma primeira varredura, não foi possível observar remoção de *debris* de tecido, pelo OCT. Aumentando o número de varreduras sobre a mesma região para 5 varreduras, alcançamos uma profundidade de $164,74 \pm 18,87 \mu\text{m}$. O ponto foi retirado do gráfico da Figura 14, por se tratar de sobreposição de pulsos. Para um número maior de varreduras, por energia de pulso.

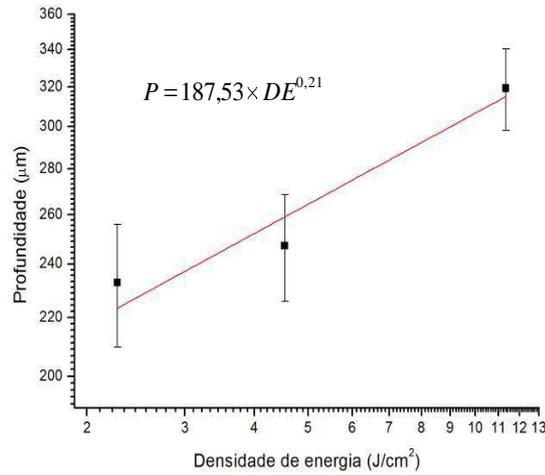


Figura 14 – Densidade de energia em função da profundidade atingida com somente uma varredura, sem sobreposição de pulsos. O melhor ajuste de curvas para o conjunto de pontos é: $P = 187,53 \times DE^{0,21}$.

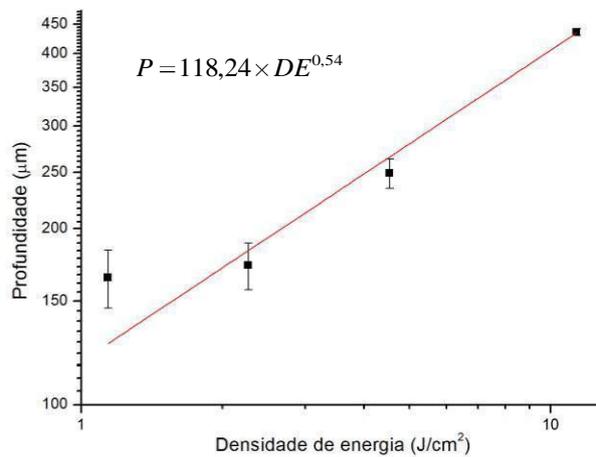


Figura 15 – Densidade de energia em função da profundidade (log x log) com 5 varreduras por área. O melhor ajuste de curvas para o conjunto de pontos é: $P = 118,24 \times DE^{0,54}$.

O processo de remoção de tecido necrosado em animais possui dificuldades experimentais ocasionadas pelo movimento respiratório. O movimento causa um deslocamento do foco na superfície da pele. Para as irradiações, utilizamos uma lente com distância focal de 50 mm. A lente utilizada para o experimento foi escolhida visando uma menor cintura do feixe na superfície. A energia adotada para a ablação do tecido necrosado foi de $10 \mu\text{J}$ devido atingir uma profundidade de remoção até mesmo fora do foco no momento da respiração do animal.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5*. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Como os dados encontrados não apresentavam em uma distribuição normal foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para a comparação dos diferentes grupos foi realizada utilizando-se o teste de *Dunns* com 5 % de significância.

CAPÍTULO 4

4. Resultados

O estudo das amostras é apresentado neste capítulo de acordo com a técnica utilizada para a sua caracterização. Primeiro apresentamos a técnica histológica, por se tratar do padrão ouro no estudo e que também servirá como guia para as demais técnicas; a seguir apresentaremos a técnica de OCT, a qual é uma técnica não invasiva, e posteriormente as técnicas de μ ATR-FTIR e microscopia não-linear, que são invasivas.

4.1. Avaliação clínica das queimaduras

As queimaduras foram provocadas conforme o item 3.2. Pela FIGURA 16 foi feito um acompanhamento da delimitação da queimadura, no dia 0, logo após a queimadura; e no dia 14, antes do início do tratamento. Pelas imagens observou-se que no dia 0, as regiões queimadas possuem um aspecto branco, com as bordas definidas e de textura como couro desidratado. No dia 3, notou-se maior irrigação sanguínea da lesão, com coloração em tons de vermelho, com uma leve formação de crosta sobre a lesão, e bordas mais elevadas que a região central.

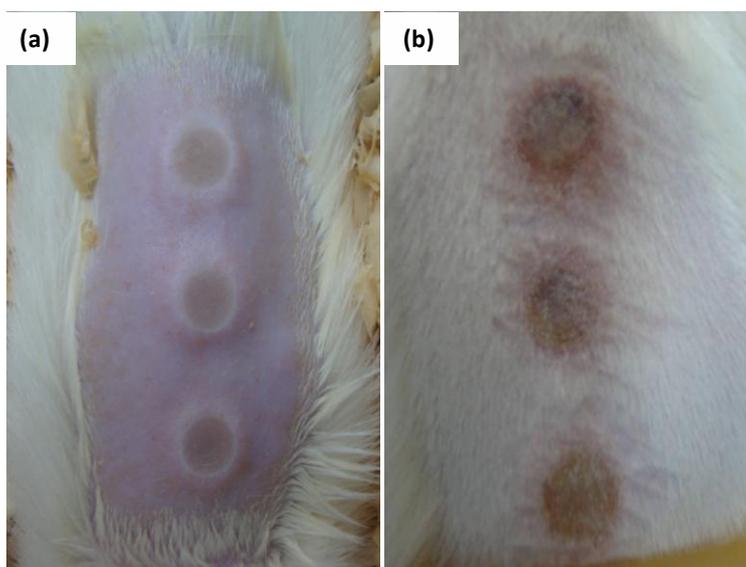


FIGURA 16 - (a) Aspecto da queimadura após a exposição à fonte de vapor; (b) Aspecto da queimadura após a delimitação (3º dia após queimadura)

4.2. Caracterização das amostras por histologia

4.2.1. Pele sadia

O tegumento é o maior órgão do corpo e constituído por dois componentes: a pele e os derivados epidérmicos, tais como as unhas, os pelos e as glândulas (glândulas sudoríparas e sebáceas, e a glândula mamária).

Nas células coradas com HE os ácidos nucléicos presentes no núcleo são corados pela hematoxilina, dando ao núcleo um tom azul-púrpura. Os elementos básicos são atraídos pela eosina, permitindo a coloração da proteína do citoplasma da célula, de tons que variam do rosa a vermelho (fibras de colágeno).

A pele é composta pela epiderme superficial (E), e a derme (D), mais profundamente situada. A epiderme é avascular e formada de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, contendo mais de uma camada de células, as quais diferenciam-se a medida que se afastam da membrana basal (MB), variando de células cubóides (que repousam na MB) a pavimentosas (superficiais). A membrana basal separa a epiderme da derme. A derme é constituída de tecido conjuntivo sobre o qual se apoia a epiderme. A junção entre a epiderme e a derme é regular nos cortes, não havendo saliências ou reentrâncias, as papilas dérmicas, o que caracteriza o epitélio de ratos. Na FIGURA 07-A, os folículos pilosos e sua porção germinativa foram apresentados em cortes tangenciais, com seus ductos geralmente desembocando na porção terminal. A derme possui duas camadas: a papilar e a reticular (FIGURA 07-B). A papilar é delgada e constituída por tecido conjuntivo frouxo, a reticular é mais espessa e constituída por tecido conjuntivo denso não modelado (FIGURA 07-C). Na camada reticular, as fibras colágenas são mais abundantes e espessas que na camada papilar. Possui ainda, vasos sanguíneos irrigando a região.

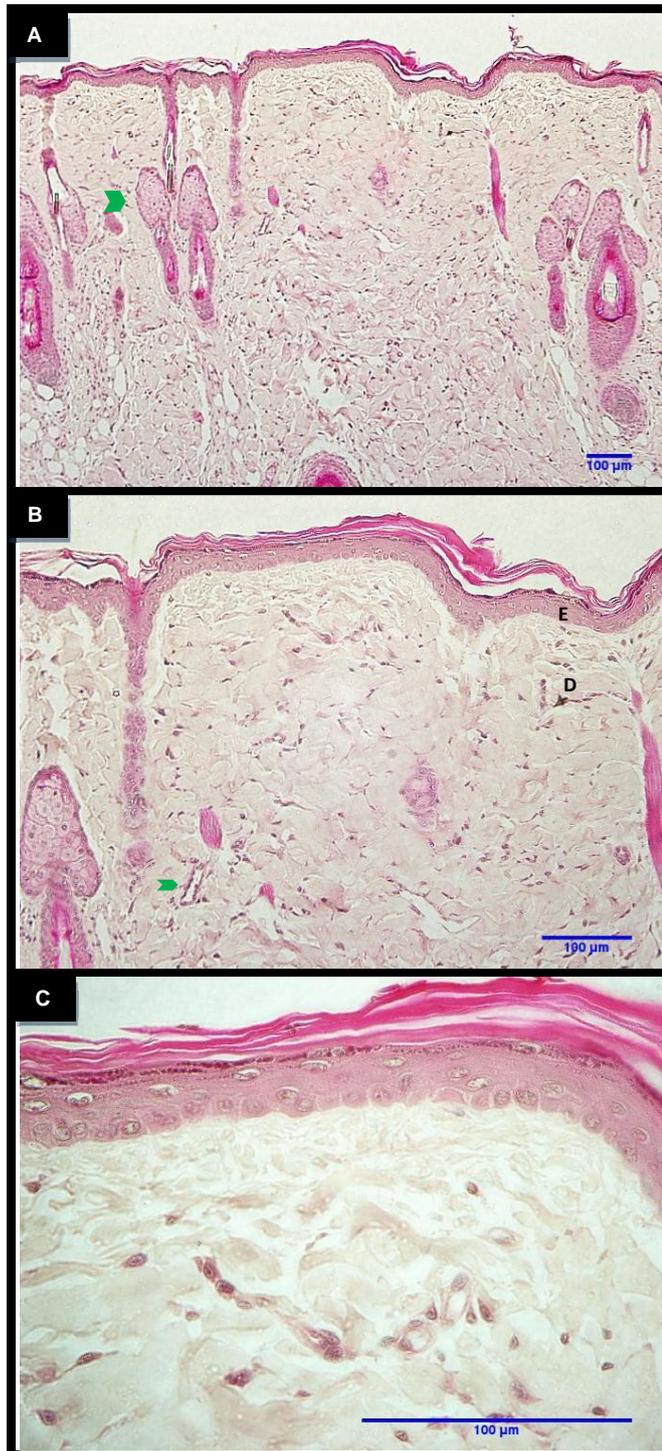


FIGURA 17 –Nos cortes histológicos com espessura de 5µm, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, da pele sadia do dorso de ratos Wistar. (A) Estrutura normal da pele, com as camadas de epiderme, derme intactas e seus apêndices dérmicos; aumento 10x. (B) e (C). Na epiderme, observa-se os queratinócitos nas suas fases de diferenciação; na derme apresenta-se a sua distribuição usual de colágeno formando feixes de fibras; aumento de 20x e 60x, respectivamente.

4.2.2. Pele queimada

A queimadura de terceiro grau ou de espessura total envolve a epiderme e a derme. Macroscopicamente, aparecem como brancas, com textura semelhante ao couro, ou carbonizadas, secas e anestésicas, devido à destruição das terminações nervosas^{39,40}. Histologicamente, o tecido desvitalizado apresenta trombose do endotélio capilar lesado, levando à morte celular induzida pela isquemia, revelando uma necrose coagulativa (zona de coagulação)⁴¹, adjacente ao tecido com vitalidade que rapidamente acumula células inflamatórias e pronunciada exsudação, devido à vasodilatação e aumento na permeabilidade microvascular. Os cortes histológicos apresentados nas FIGURA 18-A1 e B1 apresentam solução de continuidade no epitélio estratificado queratinizado no terceiro dia, com regeneração inicial no quinto dia (FIGURA 18-A2 e B2). No 3º, 5º e 7º dia os cortes apresentam folículos pilosos em corte transversal, espalhados pela derme, sendo ainda em alguns cortes encontrado no epitélio. No interior do folículo, foi apresentado uma haste queratinizada do pelo, degradada pelo aumento de temperatura.

No décimo quarto dia o epitélio apresenta-se com solução de continuidade reduzida, mais distinção entre as fibras colágenas, núcleo dos fibroblastos mais alongado denotando estado quiescente da célula.

A queimadura de terceiro grau provocada no dorso dos animais foi de espessura total, degradando o colágeno da camada reticular, destruindo as estruturas do tecido e musculatura estriada. No terceiro e quinto dia, foi observado a presença de células adiposas próximas ao epitélio, que migraram da hipoderme. Estudos com camundongos obesos mostraram que o tecido adiposo aumentou a infiltração de macrófagos e citocinas pró-inflamatórias realçando a condição inflamatória na região⁴², estudos em humanos também descreveram resultados similares para o recrutamento de macrófagos pelos adipócitos^{43,44}.

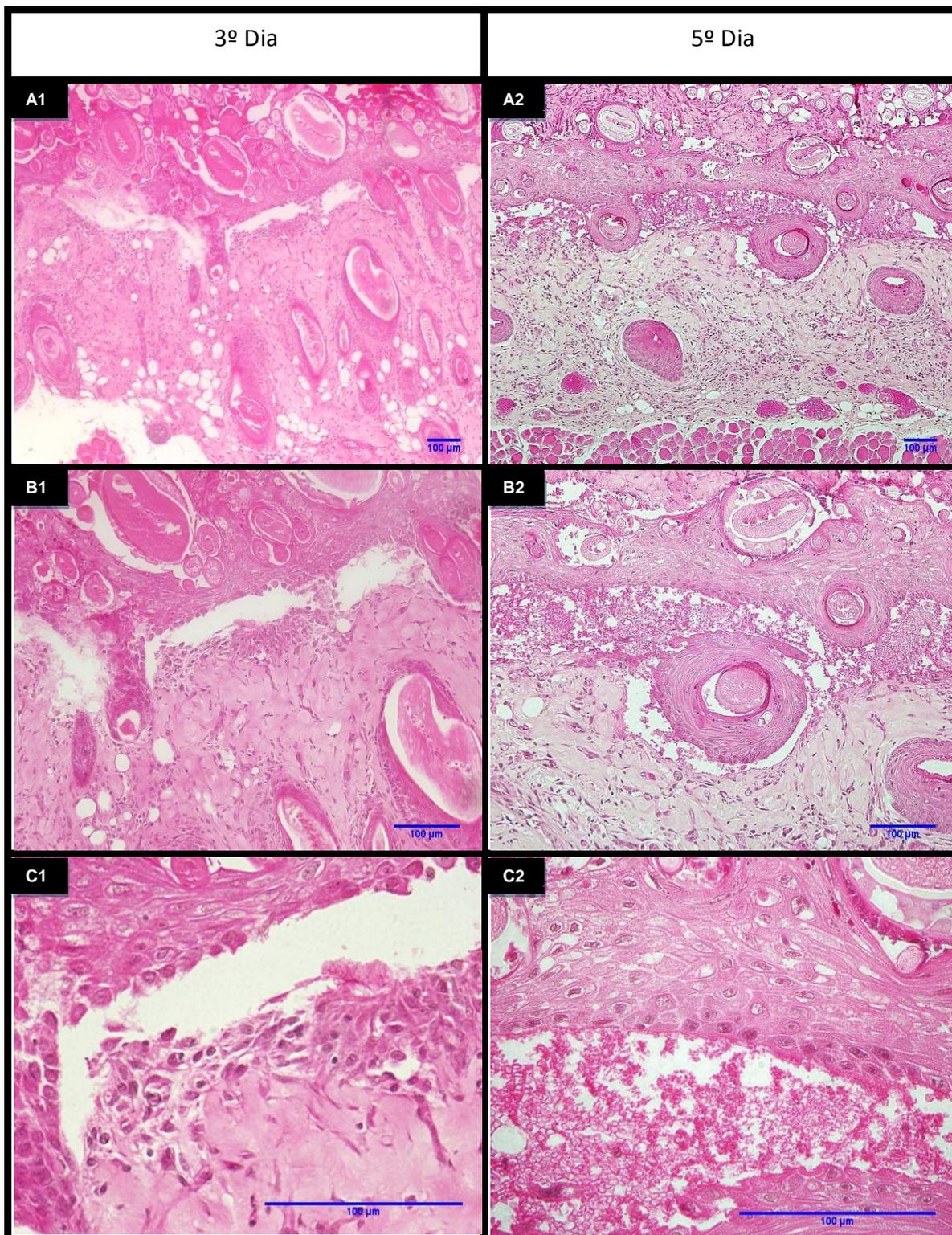


FIGURA 18 - Análise histológica de cortes de 5µm de espessura, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, de pele queimada do dorso de ratos Wistar. (A1) Estrutura da pele desorganizada, com as camadas de epiderme e derme possuindo vários folículos pilosos em corte transversal; aumento 10x. (A2) Estrutura da pele apresenta mais organização em relação ao terceiro dia, embora haja a presença de alguns folículos pilosos, em corte transversal, no epitélio. (B1) Epitélio em regeneração, apresentando irregularidade no número de camadas das células e descolamento da derme; aumento 20x. (B2) Epitélio mais exuberante, com mais camadas de células e cortes transversais de folículos pilosos; aumento 20x. (C1) e (C2) Detalhe do epitélio em aumento de 60x. No terceiro dia apresenta um descolamento do epitélio, no quinto dia o epitélio apresenta um infiltrado.

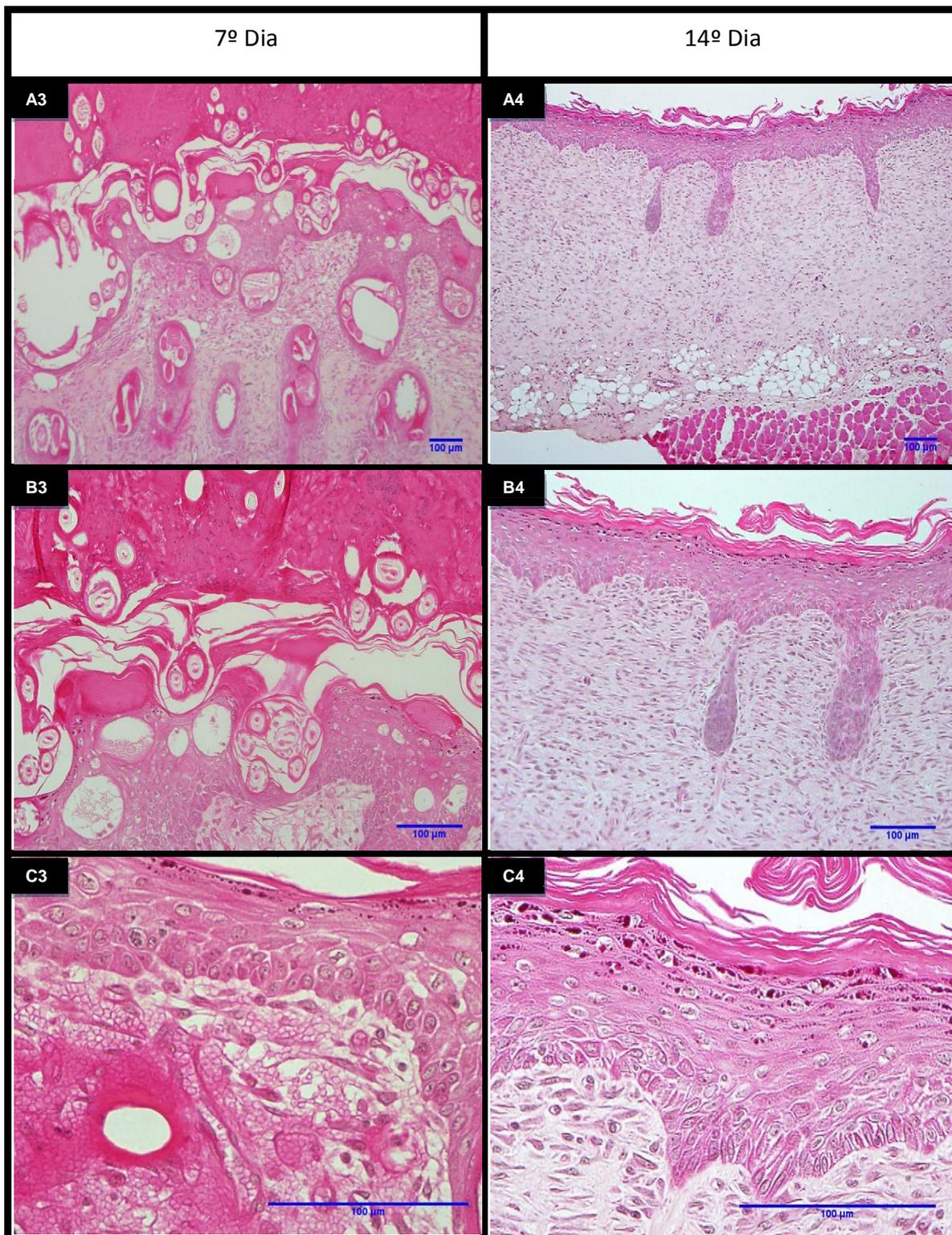


FIGURA 19 - (A3) Corte histológico no sétimo dia, apresentando folículos pilosos e epitélio irregular com reentrâncias invaginando alguns folículos e número de células em suas camadas variável; aumento 10x. **(A4)** Epitélio contínuo, com corte tangencial de glândulas sebáceas e muitos fibroblastos; aumento 10x. **(B3)** Cortes transversais de folículos pilosos incrustado na crosta da lesão e invaginados no epitélio; aumento 20x. **(B4)** Epitélio apresentando o estrato córneo e irregularidades na sua porção interna; aumento 20x. **(C3)** e **(C4)** Detalhe do epitélio no sétimo e décimo quarto dia. Epitélio apresenta maior espessura no décimo quarto dia que no sétimo dia, e seus estratos granuloso, lúcido e córneo, mais discretizados.

4.2.3. Pele desbridada

Nos cortes histológicos de pele de rato desbridada com bisturi lâmina fria, mostrados na FIGURA 20, observamos uma espessa crosta no terceiro dia (A1), epitélio em regeneração, delgado e composto de uma camada simples de queratinócitos. A derme apresenta cortes tangencias de folículos pilosos na região do bulbo (B1). A camada subcutânea apresenta adipócitos distribuídos ao longo da camada e em profundidade na derme. A musculatura estriada esquelética no fragmento apresenta-se ausente, caracterizando a queimadura de terceiro grau.

No quinto dia (A2), a crosta apresenta-se reduzida, epitélio mais espesso, formado em alguns pontos por mais de três camadas de células. Na derme (B2), apresenta folículos pilosos em corte transversal, glândulas sebáceas, vasos e poucos adipócitos na camada subcutânea. No campo, observamos muitos núcleos de fibroblastos alongados.

Os detalhes do epitélio em regeneração são mostrados em (C1) e (C2). No terceiro dia, o epitélio não possui uma organização celular definida; na derme, próximo ao epitélio, nota-se a presença de adipócitos e eosinófilos. O campo apresenta também vasos sanguíneos e fibroblastos com núcleo arredondado. No quinto dia, a crosta é menos espessa que no terceiro dia; o epitélio possui uma organização celular em camadas, sendo formado por até cinco células. A derme apresenta muitos fibroblastos, com núcleo alongado.

No sétimo dia e décimo quarto dia (FIGURA 21), observa-se uma camada de queratina espessa, epitélio composto por camadas de células sendo que no décimo quarto dia há camadas de células cubóides próxima a membrana basal e pavimentosas na região mais superior, demonstrando uma melhor organização deste epitélio. A derme apresenta um tecido conjuntivo denso bem celularizado, sem a presença de apêndices dérmicos.

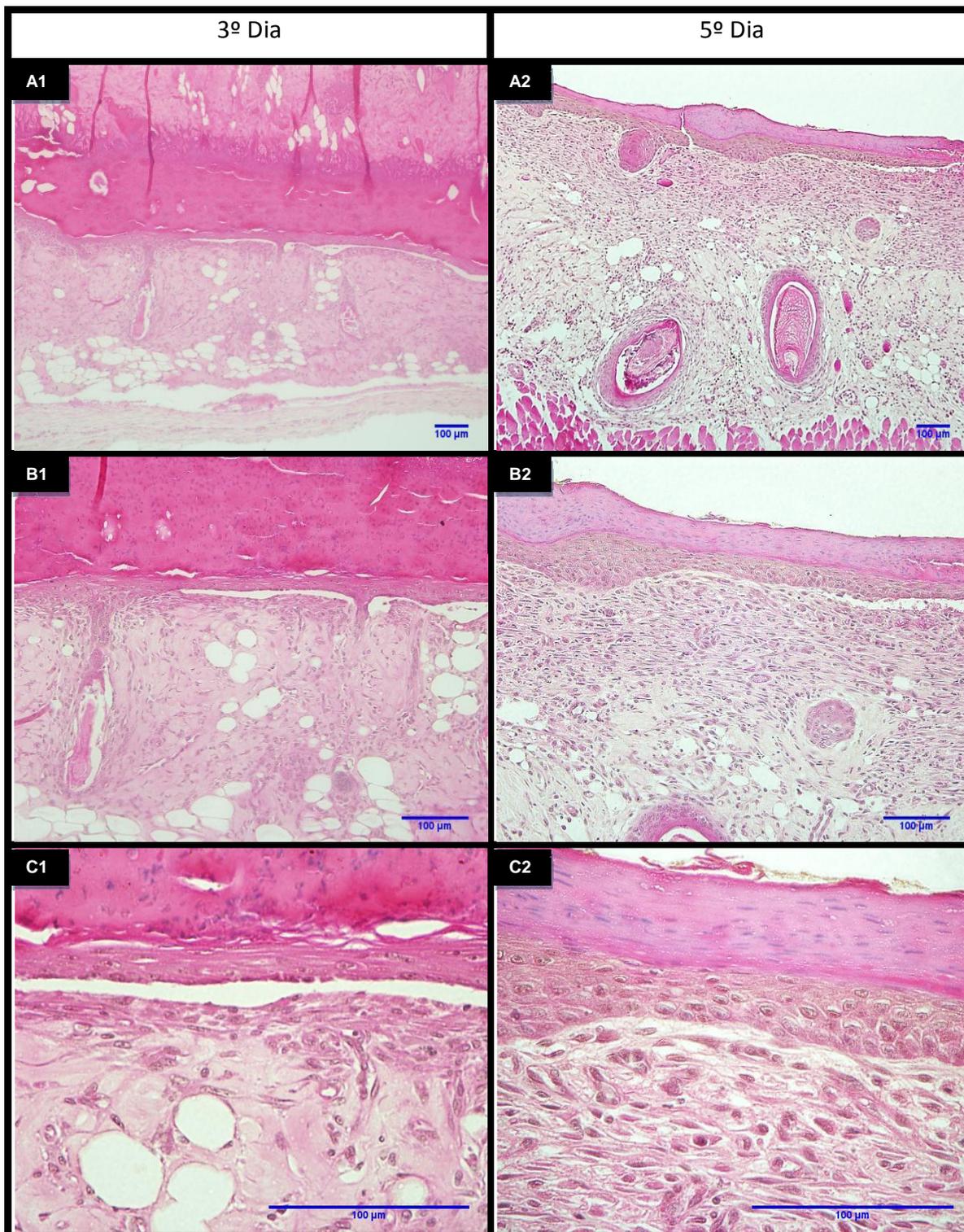


FIGURA 20 – Cortes histológicos com 5µm de espessura, parafinizados e corados por hematoxilina-eosina, de pele, do dorso de ratos Wistar, queimado e desbridado mecanicamente. (A1) Visão geral da pele, com uma crosta espessa, um epitélio em descamação, e a derme com tecido conjuntivo denso, e ausência de musculatura estriada esquelética; aumento 10x. (A2) Visão geral da pele no quinto dia, superfície coberta por uma crosta fina, epiderme e derme definidas, e presença de musculatura estriada esquelética; aumento 10x. (B1) Aumento maior da interface entre o tecido conjuntivo e a crosta, possuindo entre eles um epitélio não formado e em descamação; aumento 20x. (B2) Detalha da derme, com uma glândula sebácea no centro do campo e um epitélio em regeneração coberto por uma crosta; aumento 20x. Em (C1) e (C2) visualizamos o epitélio em detalhe com uma porção do conjuntivo, evidenciando estágios diferentes na regeneração

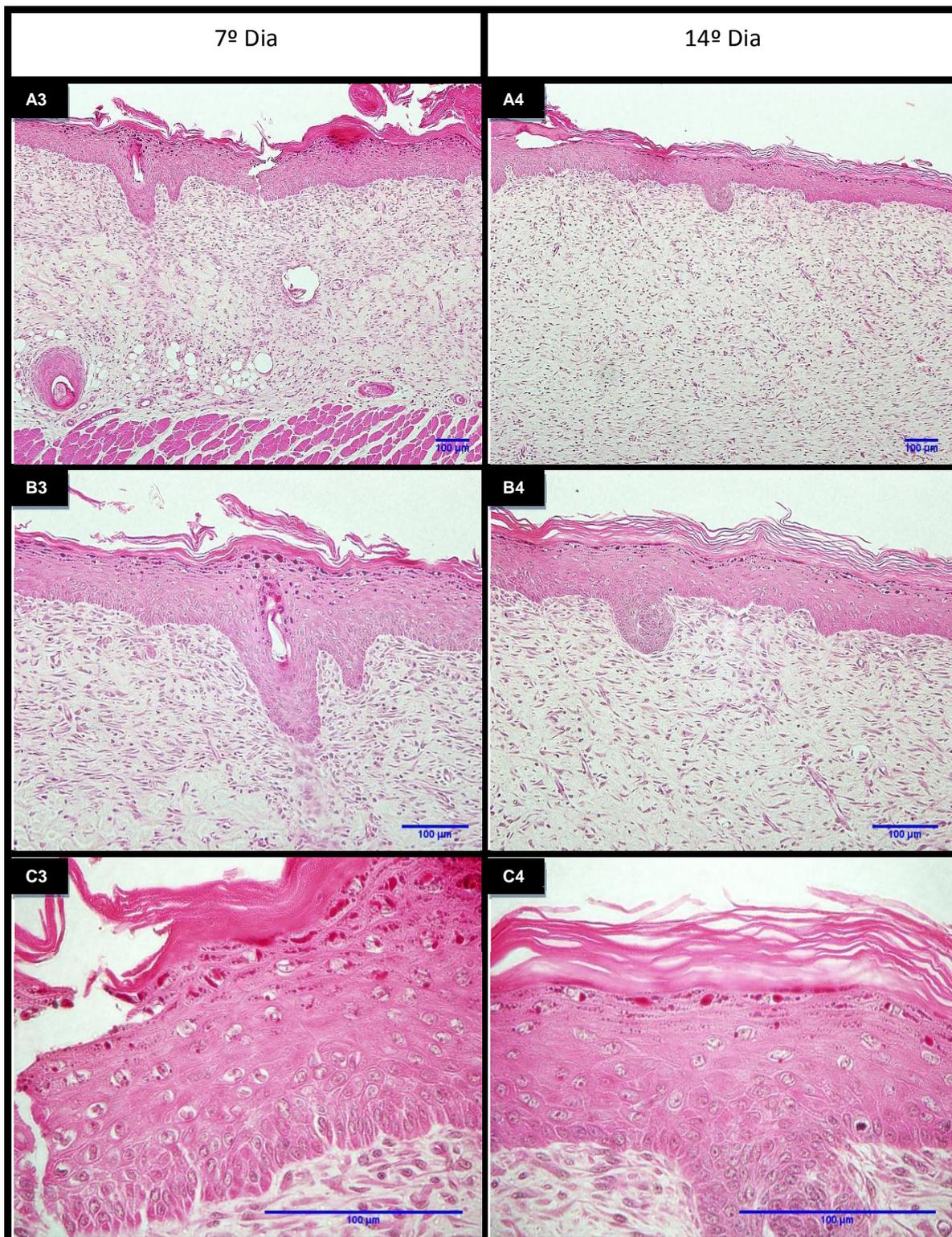


FIGURA 21 – Cortes histológicos de pele queimada e desbridada no sétimo (A3) e décimo quarto dia de acompanhamento (A4); aumento 10x. Detalhe da epiderme e derme em regeneração no sétimo (B3) e décimo quarto dia (B4); aumento 20x. Em (C3) e (C4) observa-se o epitélio exuberante, com suas camadas regeneradas; aumento 60x.

4.2.4. Pele ablacionada

Corte transversal de fragmento de pele queimada por exposição ao vapor e ablacionada com laser de femtossegundos, com energia de aproximadamente 10 μJ . No terceiro dia, a lesão (FIGURA 22-A1/B1) é recoberta por uma crosta, seguida de uma desorganização total do epitélio no centro. Nesta região há poucos folículos pilosos por campo, em grande maioria em corte transversal, apresentando em seu interior fragmentos de queratina de sua haste. A musculatura estriada esquelética no fragmento apresenta-se ausente no centro da lesão, caracterizando uma queimadura de terceiro grau. No quinto dia (A2/B2), foi observado tecido necrosado e sem vascularização na zona central da lesão, predomina ainda na região, células adipócitas, recrutando macrófagos para a região, participando no processo inflamatório.

Na FIGURA 23-A3/C3, observa-se no sétimo dia uma intensa presença de fibroblastos com núcleos alongados, nesta fase do processo regenerativo há poucos neutrófilos no campo, mas ainda há a presença de macrófagos e a regeneração do tecido muscular esquelético. No décimo quarto dia (A4/C4) o epitélio apresenta-se regenerado e hiperqueratinizado, nota-se uma derme uniforme com vasos sanguíneos em corte longitudinal, glândulas sebáceas e os fibroblastos quiescentes, com o processo de cicatrização no estágio final.

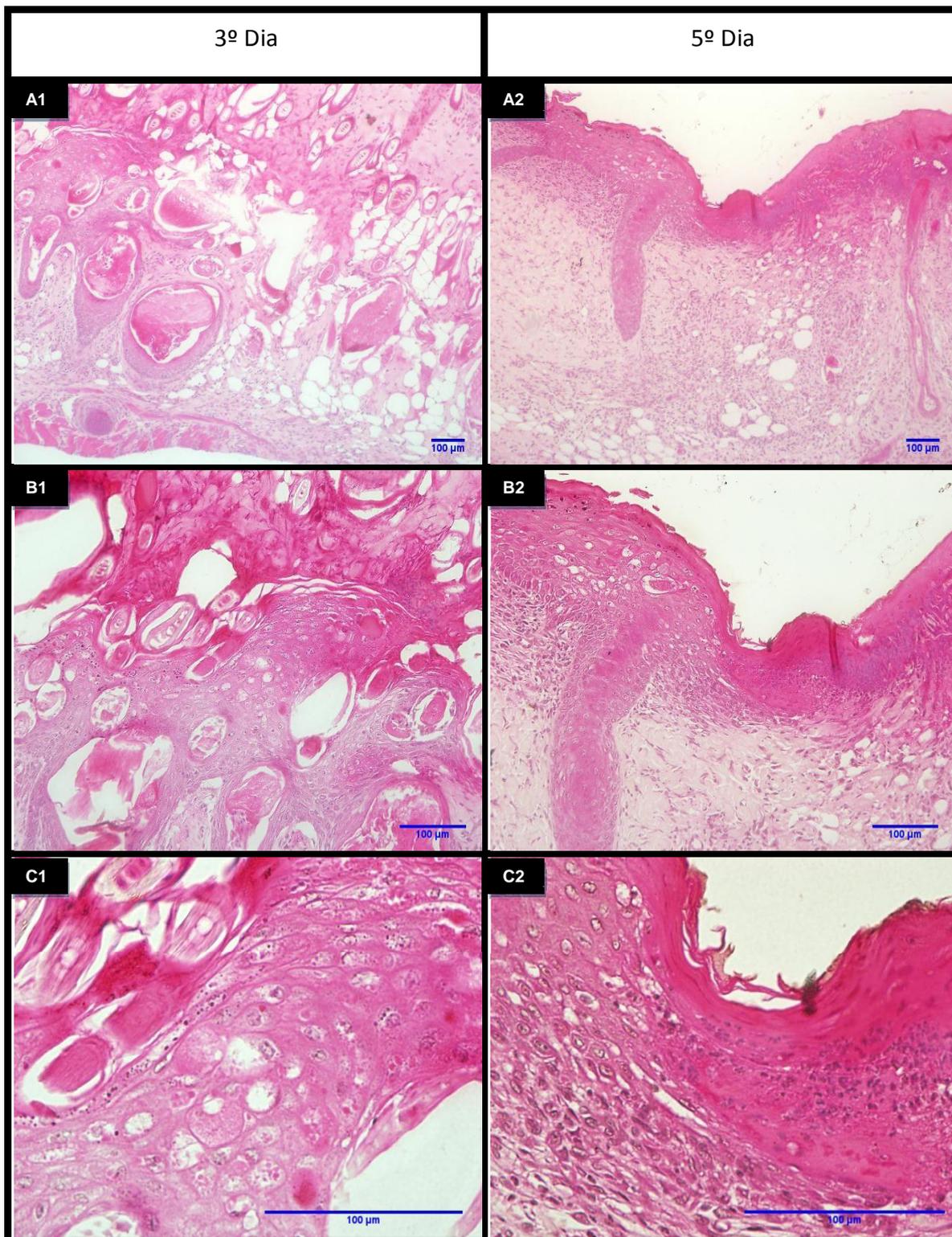


FIGURA 22 – No corte histológico do terceiro dia (A1), o campo mostra uma completa desorganização do tecido, com lesão intensa da musculatura estriada esquelética devido a temperatura; aumento 10x. (B1) Detalhe de folículos pilosos em corte transversal; aumento 20x. (C1) Detalhe da área do epitélio mostrando o início da reorganização de suas camadas; aumento 60x. No quinto dia (A2), observa-se uma visão geral do campo, com a ausência de epitélio, e alguns adipócitos próximo a superfície; aumento 10x. (B2) Detalhe do epitélio em regeneração; aumento 20x. (C2) Observa-se no corte o epitélio em regeneração sobrepondo-se a crosta da lesão; aumento 60x.

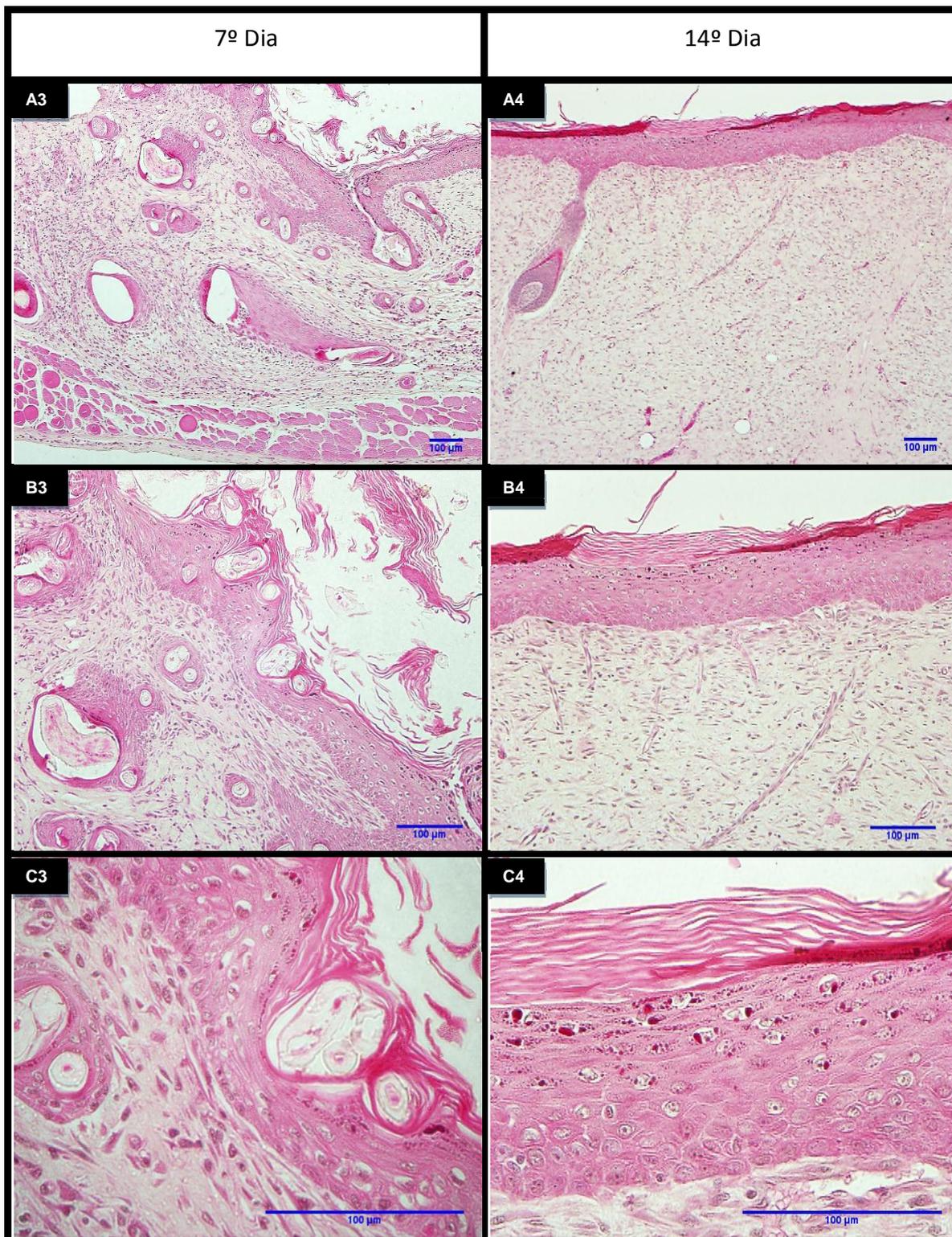


FIGURA 23 – No corte histológico do sétimo dia (A3), observa-se uma visão geral do campo, com uma reorganização do tecido em camadas e alguns folículos pilosos em corte transversal; aumento 10x. No décimo quarto dia (A4), observa-se no campo o tecido organizado, com vasos sanguíneos e glândulas sebáceas; aumento 20x. (C4) Observa-se o detalhe do epitélio queratinizado e suas camadas regeneradas ; aumento 60x.

4.3. Caracterização das amostras por OCT

4.3.1. Pele sadia

Na FIGURA 24, observamos a imagem de tomografia óptica de pele sadia. Os dados obtidos pela técnica de tomografia por coerência óptica,^{45,46} dependem da velocidade de aquisição da imagem em tempo real⁴⁷, da resolução espacial transversal para identificar as estruturas do tecido, e o contraste das imagens para diferenciar as estruturas. O sinal do OCT está mais intenso na superfície devido a um maior retroespalhamento dos fótons que atingem a camada, causado por uma maior densidade na superfície em relação ao ar. Ao atravessar a primeira barreira, a intensidade do sinal diminui à medida que os fótons se espalham pelas camadas mais profundas da pele. Abaixo dessa primeira barreira, observamos o estrato córneo (seta vermelha), homogêneo, baixo espalhamento e delimitado.

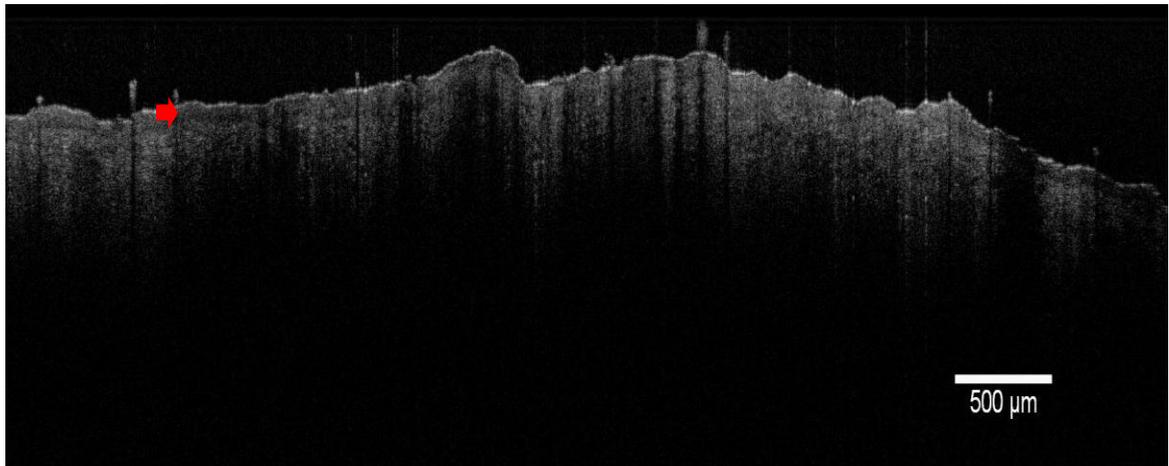


FIGURA 24 - Imagem de OCT *in vivo* de pele sadia de rato Wistar

O perfil de atenuação total da luz na pele sadia é mostrado na FIGURA 25. Pela imagem confirmamos que a penetração da luz no comprimento de onda de 930 nm atingiu uma porção mais profunda da derme. A imagem mostra o resultado da média de uma região de largura igual a 1500 μm , escolhida na região de interesse da imagem. Ao atingir a superfície da pele do animal, o sinal tem um pico de intensidade de aproximadamente 20 dB, decaindo ao longo da profundidade do tecido. O coeficiente de atenuação total medido na pele sadia foi de $0,0987 \pm 0,0307 \mu\text{m}^{-1}$.

A análise do coeficiente de atenuação total das amostras foi realizada em função de um coeficiente de atenuação total relativo. A aquisição das imagens de OCT é feita *in vivo* e o ciclo respiratório do animal faz com que o tecido sofra contrações e estiramentos em sua superfície, alterando as condições de aquisição entre as amostras o que dificulta a determinação do coeficiente para as amostras; outra característica da análise é o modelo empregado para a estimativa do coeficiente, o qual é simples e os valores de referência para a pele queimada e queimada submetida a tratamento não são disponíveis na literatura, impossibilitando uma comparação de valores. Dessa forma, apresentaremos, graficamente, somente os valores relativos dos perfis de atenuação total.

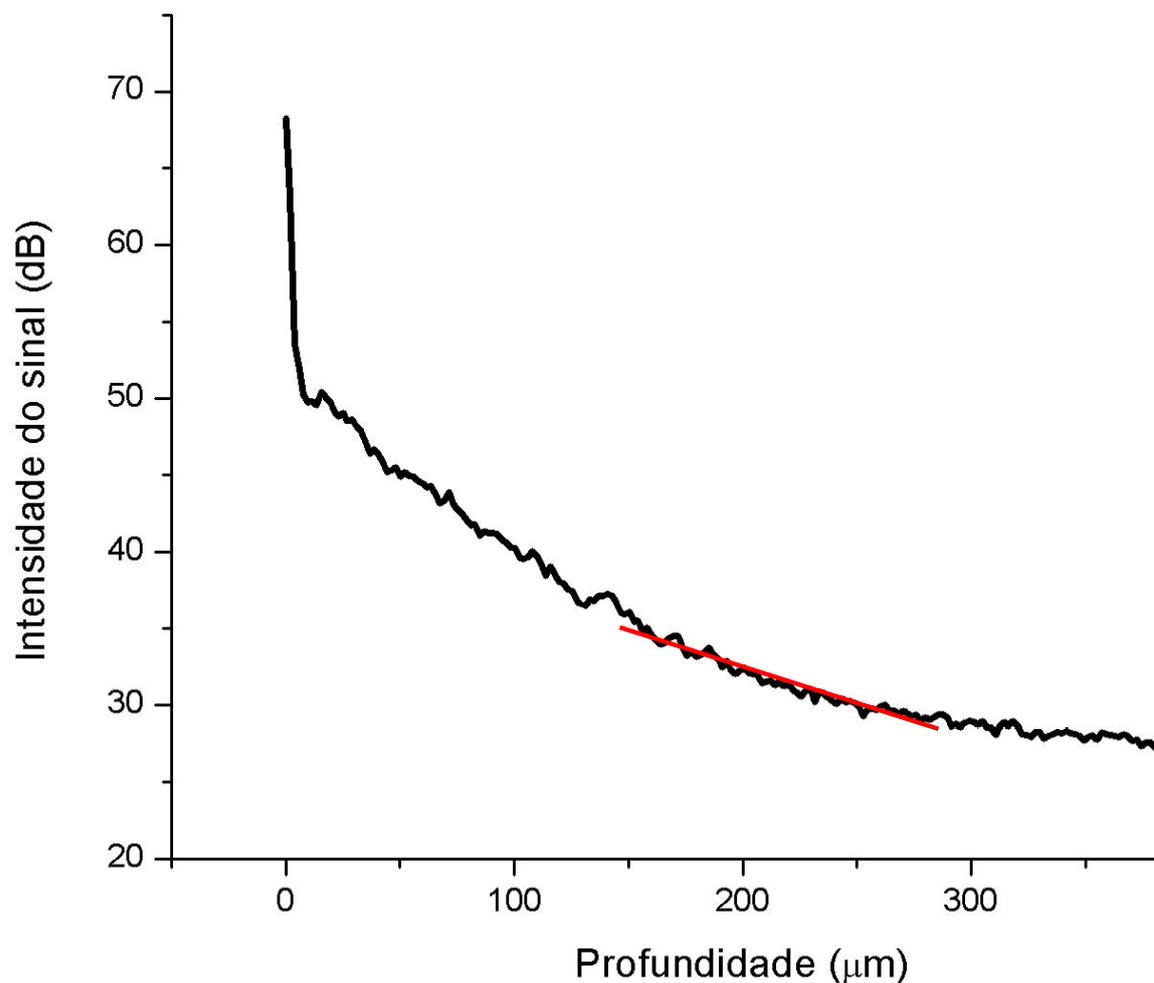


FIGURA 25 - Perfil médio de atenuação do sinal medido de 1500 μm da região de interesse da imagem de OCT com comprimento de onda de 930 nm. A linha vermelha na curva foi usada para determinar o coeficiente de atenuação total.

4.3.2. Pele queimada

As imagens de OCT de pele com queimadura de terceiro grau, nos dias de sacrifício, foram comparadas com as imagens de pele sadia para caracterização. A intensidade do sinal é maior na superfície da lesão, devido ao retroespalhamento, e atenua ao entrar no tecido. O aumento de luminosidade na superfície é devido ao tecido necrosado pela queimadura, determinada pela desnaturação da maioria das proteínas celulares. A intensidade do sinal diminui à medida que os fótons se espalham pelas camadas mais profundas da pele, não encontrando estruturas mais densas, indicando não

haver apêndices dérmicos. A superfície apresenta muita irregularidade no terceiro dia, devido a pelos incrustados na crosta da lesão, conforme foi observado na FIGURA 26. Pela imagem não foi possível observar a camada de epitélio ou estruturas na derme, uma vez que o sinal foi menos retroespalhado abaixo da superfície. Nos dias subsequentes, a intensidade do sinal aumenta, com a regeneração parcial do epitélio, observando-se no décimo quarto dia um epitélio mais espesso (seta vermelha).

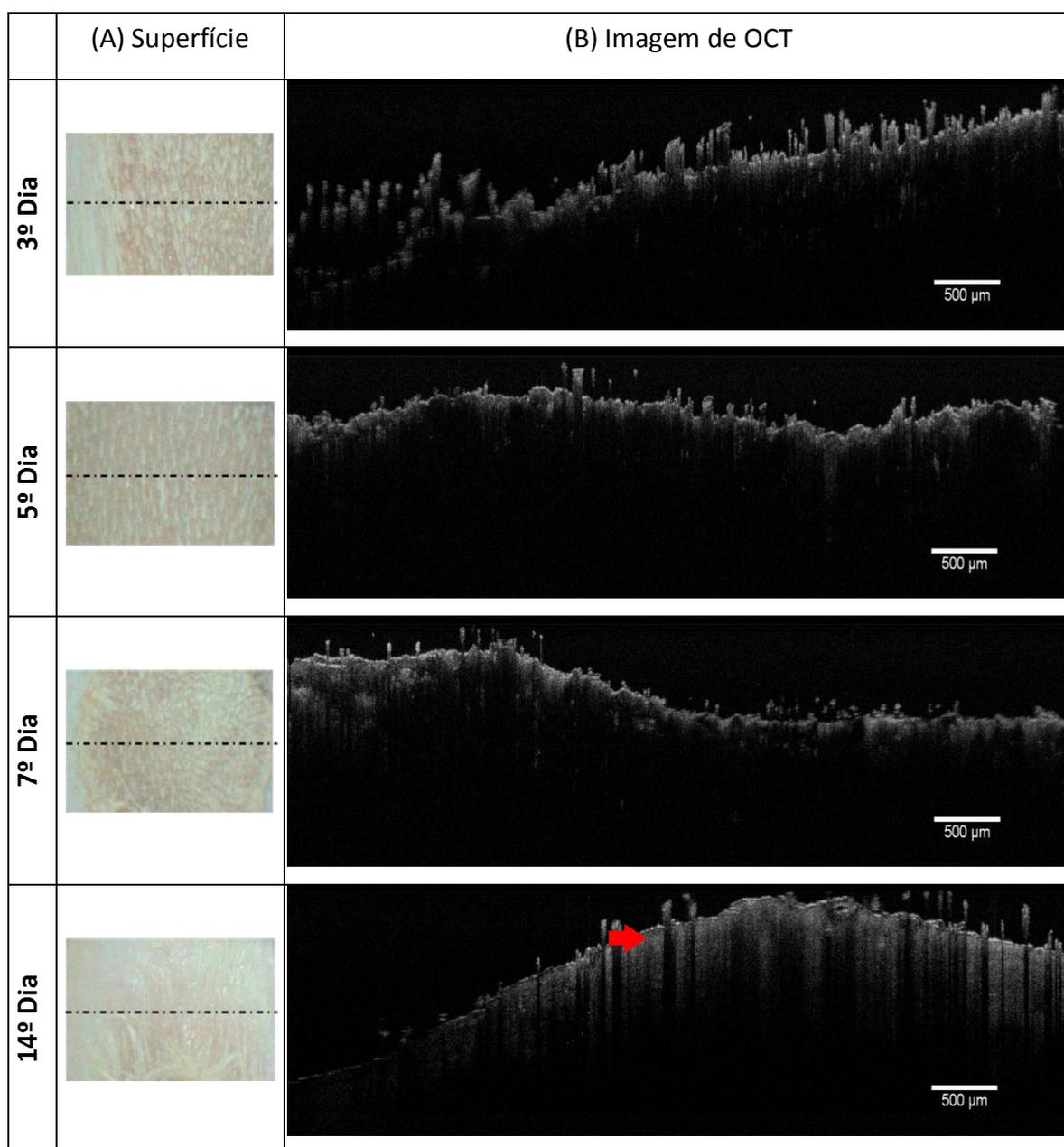


FIGURA 26 - Imagem de OCT *in vivo* de pele de ratos Wistar, queimada por exposição à fonte de vapor e sacrificado no 3º, 5º, 7º e 14º dia.

4.3.3. Pele queimada e tratada por desbridamento

O desbridamento cirúrgico do tecido necrosado foi realizado por meio de bisturi lâmina fria, removendo a *debris* de tecido até a profundidade em que há tecido vascularizado, ou o aparecimento de algumas gotas de sangue. As imagens tomográficas capturadas no terceiro dia pós-tratamento (FIGURA 27), mostram a pele com sinal menos intenso na superfície que no tecido necrosado, não se observa camadas abaixo da superfície ou estruturas aparentes. No quinto dia a superfície permanece irregular, sem a presença de camadas ou apêndices dérmicos. A partir do sétimo dia observa-se um retroespalhamento mais uniforme ao longo da profundidade do tecido, indicando uma regeneração do tecido, porém ainda não se observa a formação de uma camada de epitélio. Na imagem nota-se um rebaixamento na superfície e uma estrutura logo abaixo que se assemelha a uma camada (seta vermelha). Estudando a imagem da superfície, pode-se avaliar que se trata de uma região de crosta na lesão. No décimo quarto dia observa-se uma maior uniformidade da superfície da pele, o aparecimento de uma camada, supostamente de epitélio neoformado (seta verde).

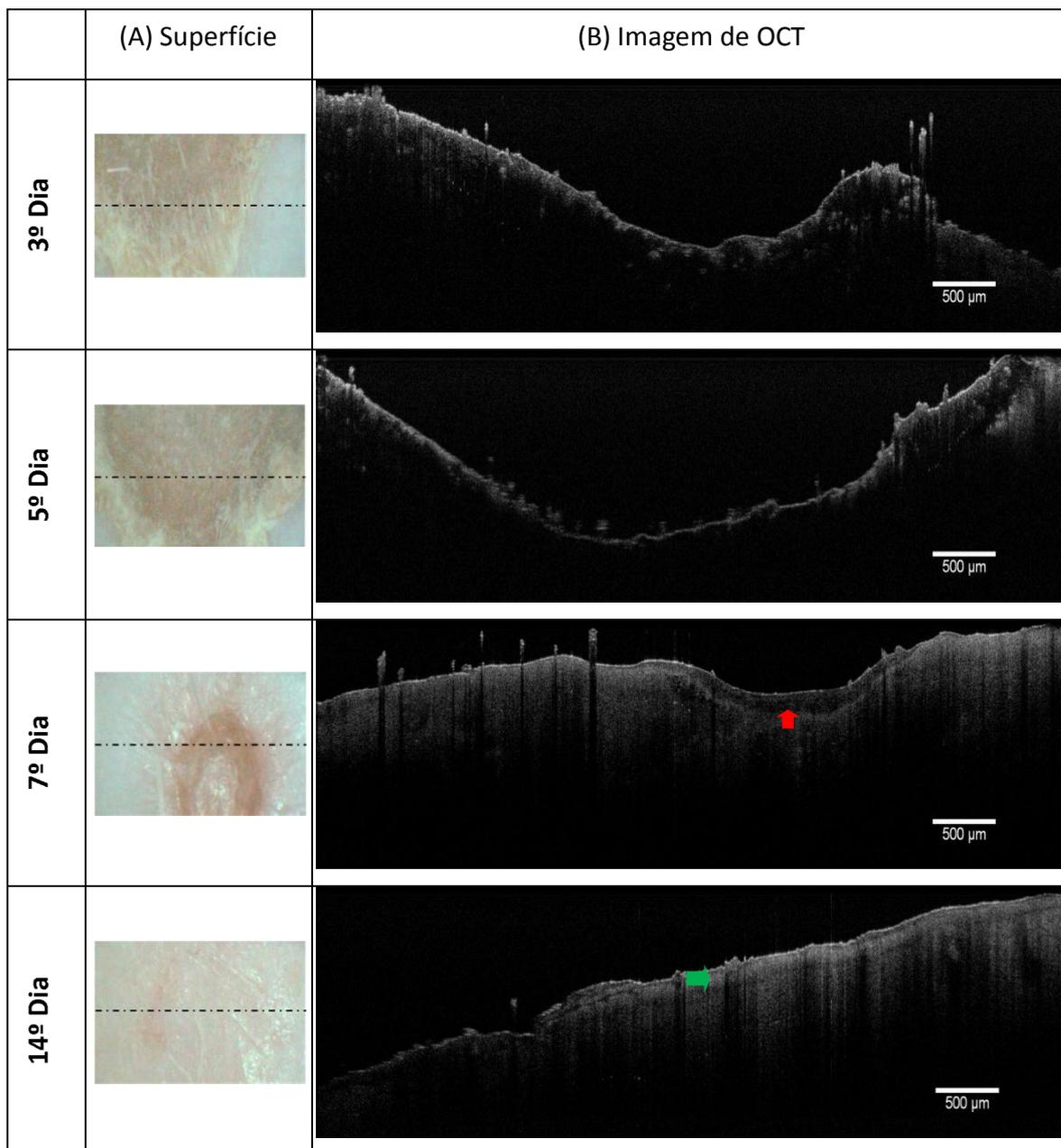


FIGURA 27 - (A) Imagem superficial da lesão, onde a linha traceja indica a posição aproximada da região de interesse do OCT. (B) Imagem de OCT *in vivo* de pele queimada de ratos Wistar, com debridamento cirúrgico no dia zero e sacrificados no 3º, 5º, 7º e 14º dia

4.3.4. Pele queimada e tratada por ablação

O tecido queimado foi ablaionado com laser de femtossegundos para remoção da *debris*. A energia utilizada para remoção foi de 10 µJ. Na FIGURA 28 mostramos as imagens tomográficas nos quatro momentos de tomada de dados. No terceiro dia, observamos a ausência de epitélio, porém há alguns pelos na superfície, causando espalhamento da luz. No quinto dia observamos a superfície do tecido

uniforme, sem pelos e abaixo da superfície o espalhamento é mais uniforme, porém sem a presença de camadas ou estruturas. A lesão ainda esta em regeneração, pois nota-se na imagem uma região mais profunda (seta verde), localizada à esquerda da imagem e no centro da lesão. No sétimo dia observamos que a lesão esta quase regenerada, pela imagem superficial, e pela imagem tomográfica observamos que abaixo da superfície há um maior espalhamento da luz no tecido o que provavelmente deve-se a uma maior uniformidade na derme, porém sem a presença de uma camada de epitélio,. Na imagem observamos uma linha branca pontilhada, que não indica uma camada e sim um artefato de técnica. No décimo quarto dia repete-se o padrão de imagem observado no sétimo dia, porém com a presença de um epitélio (seta vermelha). Pela imagem de superfície observa-se a ausência de crosta, indicando o fechamento da lesão.

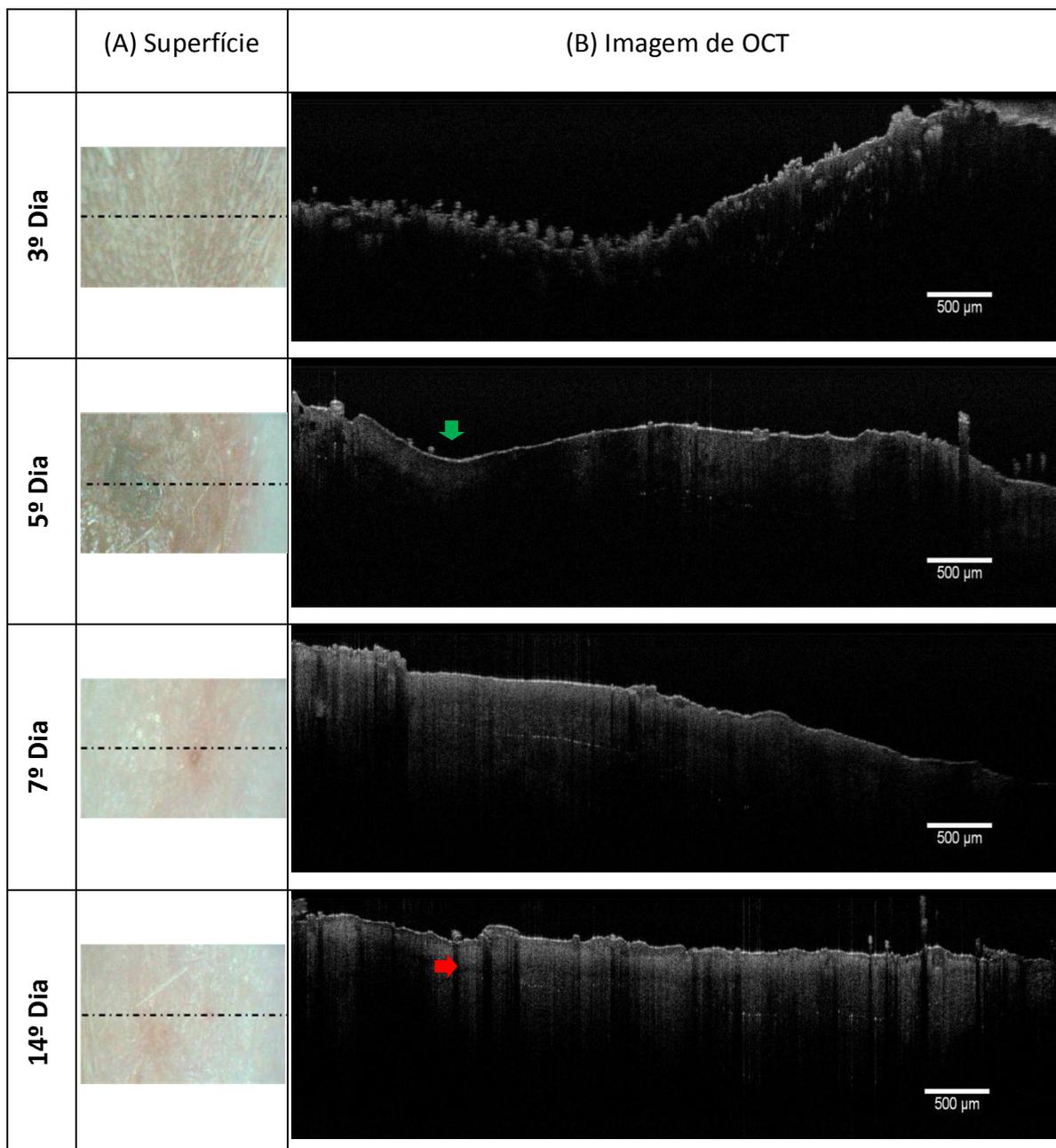


FIGURA 28 - (A) Imagem superficial da lesão, onde a linha tracejada indica a posição aproximada da região de interesse do OCT. **(B)** Imagem de OCT *in vivo* de pele queimada de ratos Wistar, ablacionada com laser de femtossegundos com energia de 10 μ J no dia zero e sacrificados no 3º, 5º, 7º e 14º dia.

A variação do coeficiente de atenuação total em função do período de cicatrização da lesão foi observada nas amostras. A FIGURA 29 mostra o coeficiente de atenuação total relativo o qual foi estimado das tomografias de OCT em função da pele sadia. A variação do coeficiente de atenuação para a pele desbridada foi maior que para as outras amostras no terceiro dia.

O desbridamento cirúrgico usando lâmina fria expõe o tecido para a promoção da cicatrização, nesse processo, vasos sanguíneos ficam expostos ou mais próximos a superfície. O coeficiente de atenuação na pele seja sadia ou queimada é dependente da soma da absorção e espalhamento no interior do tecido. A presença de fluxo sanguíneo próximo a superfície, pode afetar o coeficiente de atenuação total usando o comprimento de onda de 930 nm⁴⁸, causado pela absorção da hemoglobina, conforme descrito pela curva azul, no terceiro dia.

No tecido ablacionado o mesmo efeito não foi observado, devido ao maior controle da profundidade atingida pelo laser, e as irradiações foram feitas gradativamente, de maneira a não remover tecido além da base da lesão.

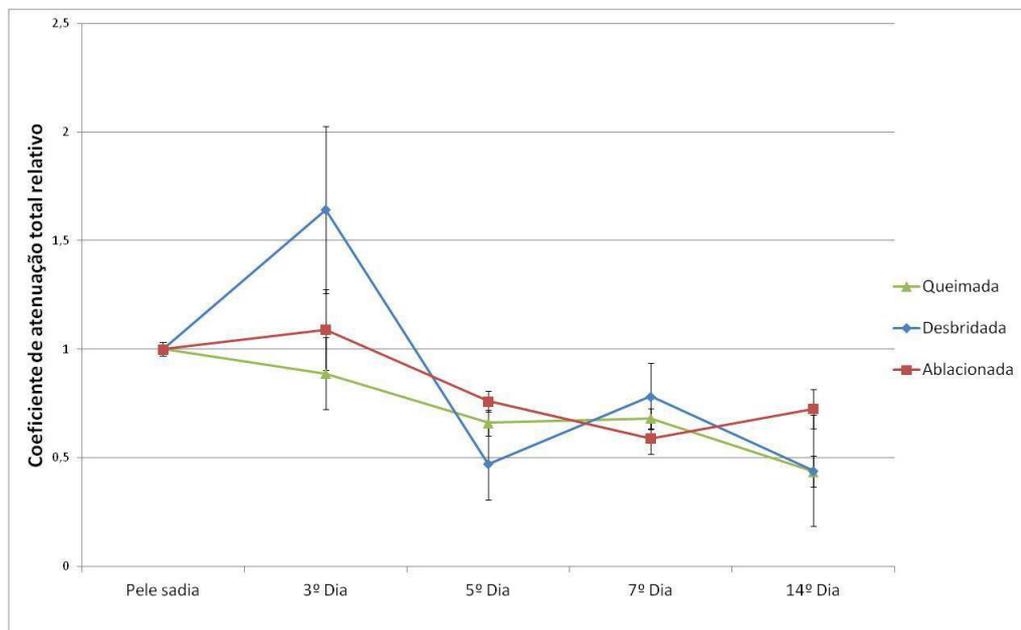


FIGURA 29 - Coeficiente de atenuação total relativo das amostras de pele queimada e queimada submetida a tratamento em função do tempo de acompanhamento da cicatrização.

As amostras foram agrupadas conforme os dias de acompanhamento do processo de cicatrização. Analisando as amostras em cada um dos dias, foi observado que entre elas não houve diferença estatística. O tratamento de queimaduras usando ablação laser, não apresentou diferenças significativas do tratamento padrão e da queimadura, ao considerar a regeneração da propriedade óptica do tecido por meio do coeficiente de atenuação total em função do tempo de regeneração.

4.4. Caracterização das amostras por μ ATR-FTIR

Para a análise espectroscópica, enfatizamos o estudo na camada da derme, uma vez que a epiderme é totalmente destruída na zona de injúria da queimadura. Uma imagem típica de um corte transversal de uma pele sadia, e suas camadas, vista por um microscópio de luz, foi mostrado na subseção 4.2.1. A estrutura de suporte e de ligação da derme são associadas ao tecido conjuntivo que a compõe. Do ponto de vista estrutural, o tecido conjuntivo da derme da pele é composto proporcionalmente de mais fibras colágenas, fibras reticulares e fibras elásticas do que células de fibroblastos; e circundando as células esta a substância fundamental.

A matriz extracelular é o principal componente do tecido conjuntivo. Ele é uma associação de colágenos, glicoproteínas não-colagênicas e proteoglicanos, formando a substância fundamental.

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e é responsável por aproximadamente 25% de toda a proteína em seres humanos^{49,50}. Ele sofre grande degradação nas queimaduras de terceiro grau, e constitui 55% da derme, sendo também o principal componente dos ossos, cartilagens e tendões. A estrutura conformacional da molécula de colágeno possui a forma de uma tripla hélice sem centro de simetria. Foram identificados em torno de 20 tipos de colágeno, a principal diferença entre os tipos, deve-se a posição dos amino ácidos na conformação estrutural da molécula. Uma cadeia de moléculas de colágeno se organiza em estruturas altamente organizadas formando um feixe de fibrilas. As fibrilas de colágeno são constituídas em 95% de três cadeias, as R-cadeias, cada uma possui uma sequência específica de aminoácidos. Dependendo da conformação dessas cadeias, forma-se um tipo de colágeno no tecido⁵¹.

Quatro bandas de absorção são relevantes para o estudo da regeneração do tecido conjuntivo lesionado, pois fornecem informações estruturais do processo de cicatrização, são elas: 3300 cm^{-1} (O-H e N-H), 1645 cm^{-1} (amida I), 1545 cm^{-1} (amida II), 1245 cm^{-1} (amida III). A razão da área sobre a curva da amida I/amida II está diretamente relacionada com a água presente no tecido. Essa razão é conhecida como fator de hidratação⁵².

Um espectro típico de um corte crio-seccionado de pele sadia obtido por μ ATR-FTIR é mostrado na FIGURA 30. O espectro no infravermelho apresenta as bandas características da pele e em destaque as bandas de interesse para o estudo. A região espectral entre 3000 e 2800 cm^{-1} é devido ao estiramento de vibrações C-H de cadeias de hidrocarboneto. As bandas localizadas entre 1800 a 1500 cm^{-1} são dominadas por absorções proteicas ou de dupla ligação. A região espectral entre 1500 e 800 cm^{-1} é conhecida como *fingerprint* e origina-se de ligações do tipo C-O-P, C-O-C e vibrações de ácidos nucleicos do tipo C-C, lipídio carboidratados. Outras vibrações moleculares também estão presentes nesta região espectral: estiramento de fosfato presente no DNA e RNA e fosfolipídios. Cabe salientar que o espectro típico de pele sadia, pele queimada e pele submetida aos tratamentos, apresenta bandas nas mesmas regiões. As variações ocorrem na intensidade e na largura das bandas, variações essas que serão discutidas nas seções posteriores.

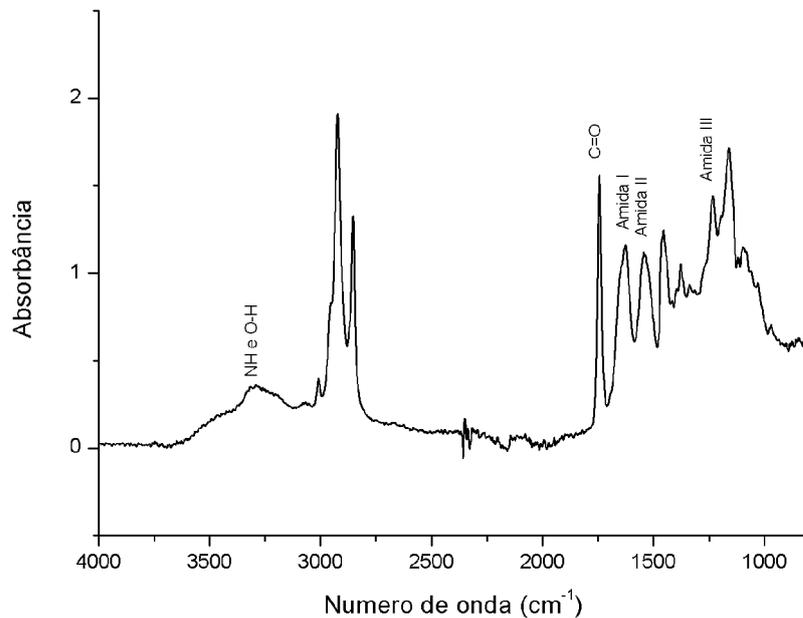


FIGURA 30 - Espectro de absorção obtido de pele sadia na região espectral de 4000 cm^{-1} a 800 cm^{-1} .

Nas FIGURA 31, 22 e 23 o espectro representativo da pele queimada, debridada e ablacionada, são apresentados respectivamente. Uma vez que o perfil espectral observado é semelhante para todas as amostras ao longo do tempo de estudo, foi apresentado somente o espectro obtido no terceiro dia de estudo. A análise das bandas foi efetuada durante todo o período de acompanhamento do processo de cicatrização e mostrada no fim da seção.

Os resultados das análises serão baseadas nas áreas abaixo das bandas destacadas. Analisando a região de *fingerprint* a banda de menor frequência do nosso estudo, esta relacionada a amida III, centrada aproximadamente em 1245 cm^{-1} , a qual corresponde aos modos vibracionais de deformação do tipo *wagging* (δ) da molécula de CH_2 e estiramento desordenado (ν) da molécula de CN da amida III⁵³.

A banda centrada aproximadamente em 1545 cm^{-1} , refere-se a amida II, a qual corresponde aos modos vibracionais de deformação angular da molécula de NH e de estiramento da molécula de CN.

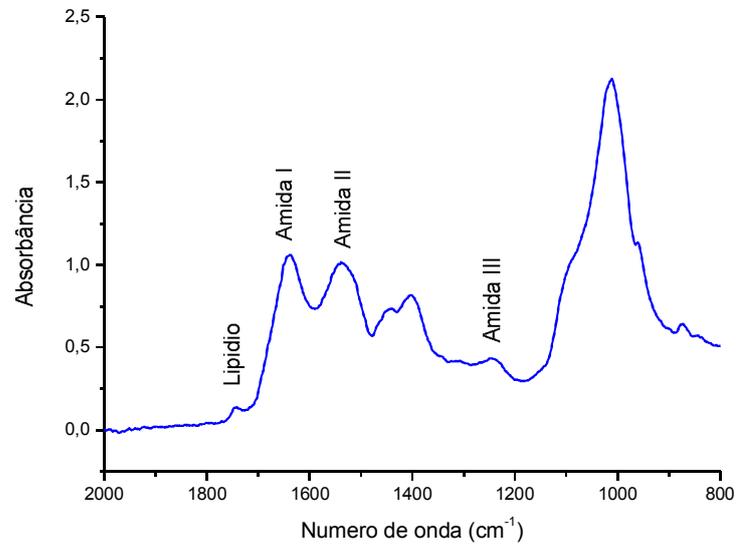
A banda de amida I, centrada aproximadamente em 1645 cm^{-1} , corresponde ao modo vibracional de estiramento desordenado da molécula de C=O, acoplado ao

modos vibracionais de deformação angular da molécula de N-H e do estiramento da molécula de C-N das estruturas secundárias da proteína.

A banda centrada aproximadamente em 3300 cm^{-1} , a mais larga das bandas estudadas, corresponde aos modos vibracionais de estiramentos simétricos das moléculas de N-H e O-H, sendo ainda correspondente ao modo vibracional de estiramento da molécula de N-H, ligada ao hidrogênio, a qual refere-se a amida A.

No estudo dos espectros de absorção das amostras de pele sadia, queimada e submetidas ao tratamento de desbridamento e ablação, analisamos individualmente as bandas de interesse, através do cálculo das áreas das mesmas, conforme descrito na seção 3.3.4.

(A)



(B)

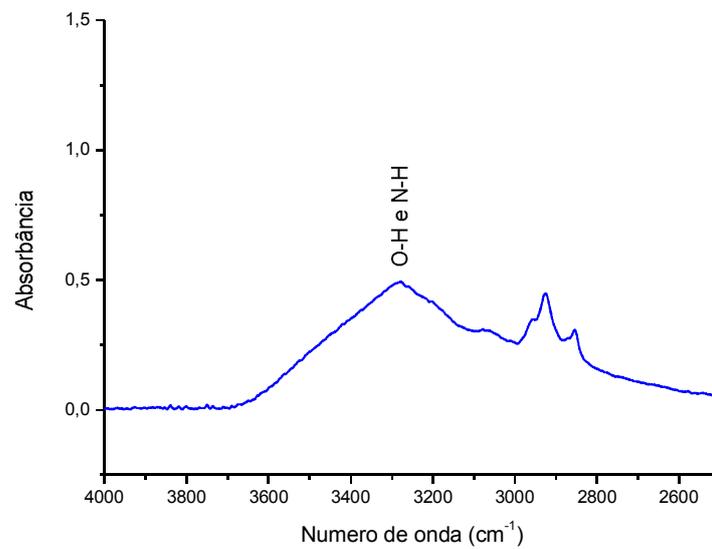
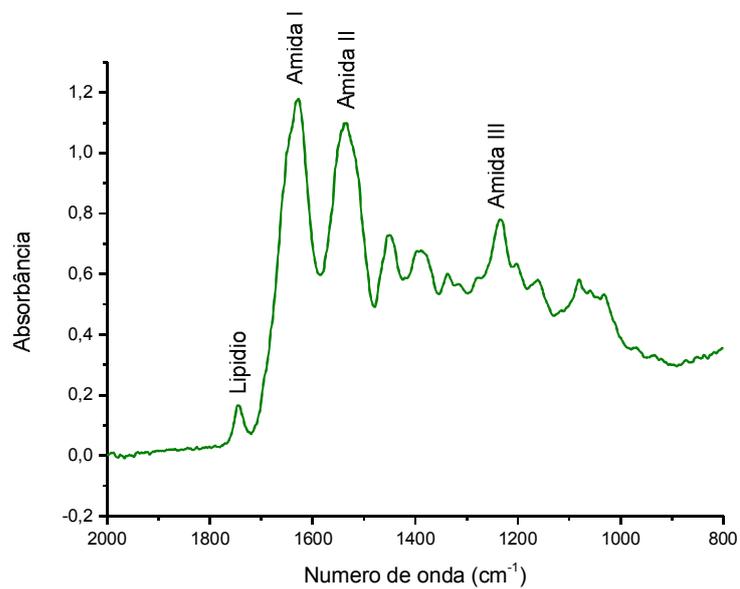


FIGURA 31 - Espectro de absorção obtido de pele queimada. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm⁻¹, sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm⁻¹ e 800 cm⁻¹ ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm⁻¹ e 2500 cm⁻¹

(A)



(B)

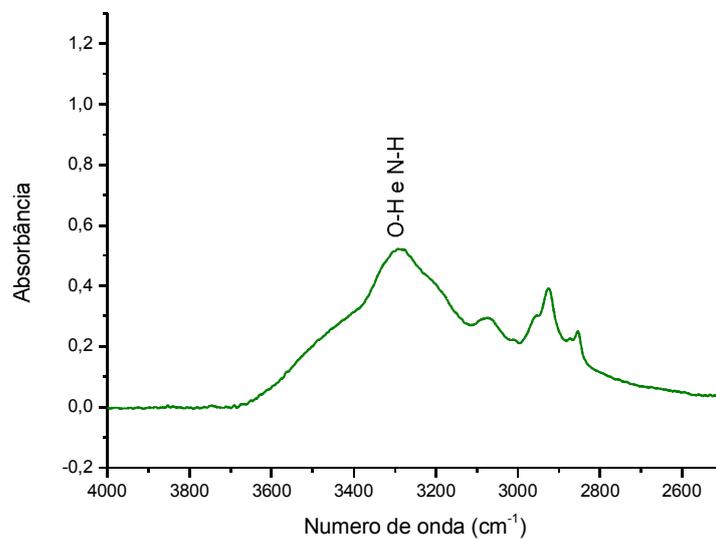
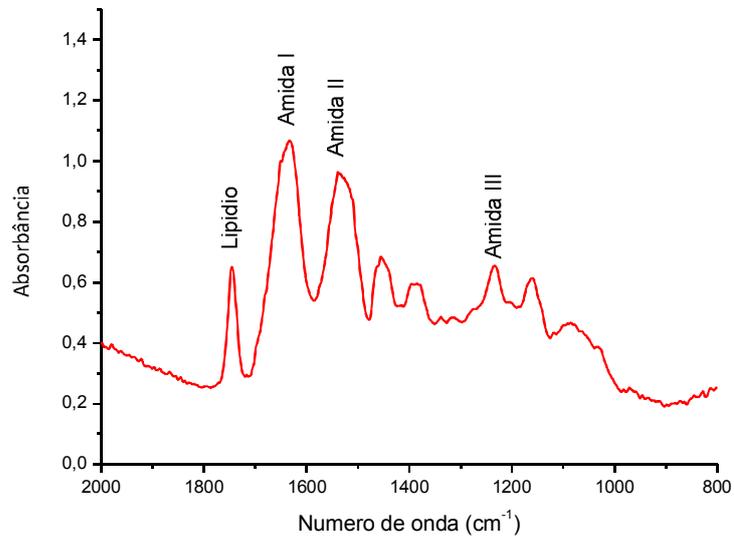


FIGURA 32 - Espectro de absorção obtido de pele queimada e submetida ao tratamento por desbridamento. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm^{-1} , sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm^{-1} e 800 cm^{-1} ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm^{-1} e 2500 cm^{-1}

(A)



(B)

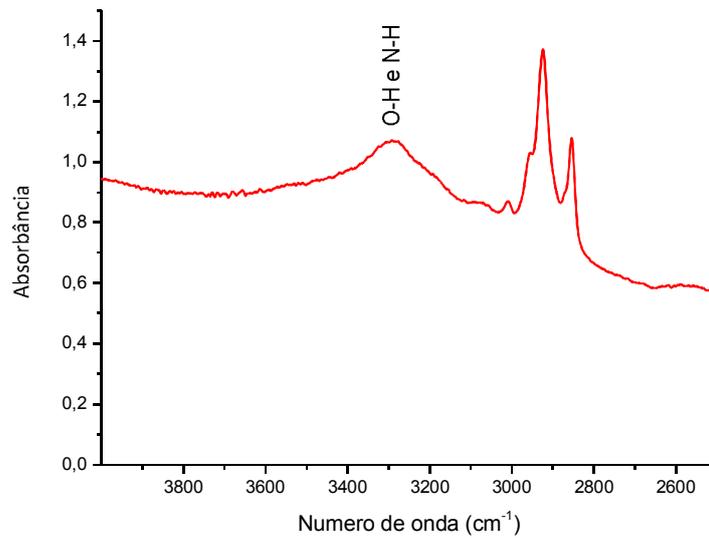


FIGURA 33 - Espectro de absorção obtido de pele queimada e submetida ao tratamento por ablação laser. Os espectros foram normalizados pela intensidade da banda de absorção localizado em 1645 cm^{-1} , sendo esta associada ao estiramento da ligação C=O na molécula de amida I. (A) Detalhe da região espectral entre 2000 cm^{-1} e 800 cm^{-1} ; (B) Detalhe da região espectral entre 4000 cm^{-1} e 2500 cm^{-1}

No estudo da razão das bandas de amida I/amida II (FIGURA 34), também conhecido como fator de hidratação; amida III/amida I(FIGURA 35); OH/amida I(FIGURA 36) não observamos diferença estatísticas significativas entre os tratamentos nos dias de análise.

Para o fator de hidratação da pele, os resultados esperados seriam um aumento da razão nos primeiros dias devido ao edema local, com redução ao longo do tempo. Uma vez que não possuímos um grupo de análise no dia 0, logo após a queimadura, e outro no dia que precede o tratamento não podemos elucidar se o comportamento esperado seria detectado pela técnica espectroscópica.

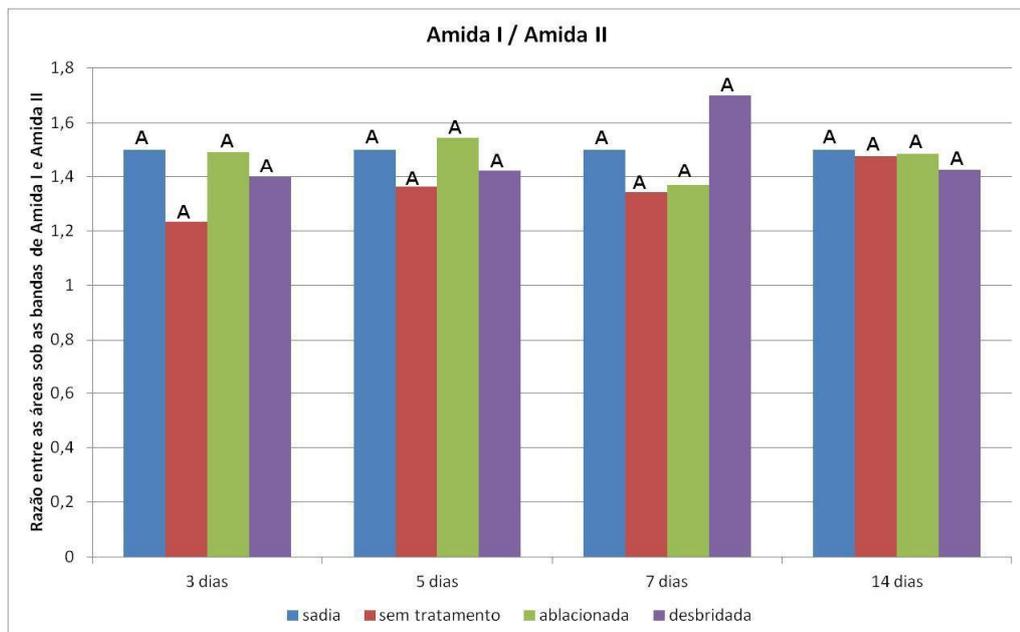


FIGURA 34 - Razão entre as áreas sob as bandas de Amida I e Amida II, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.

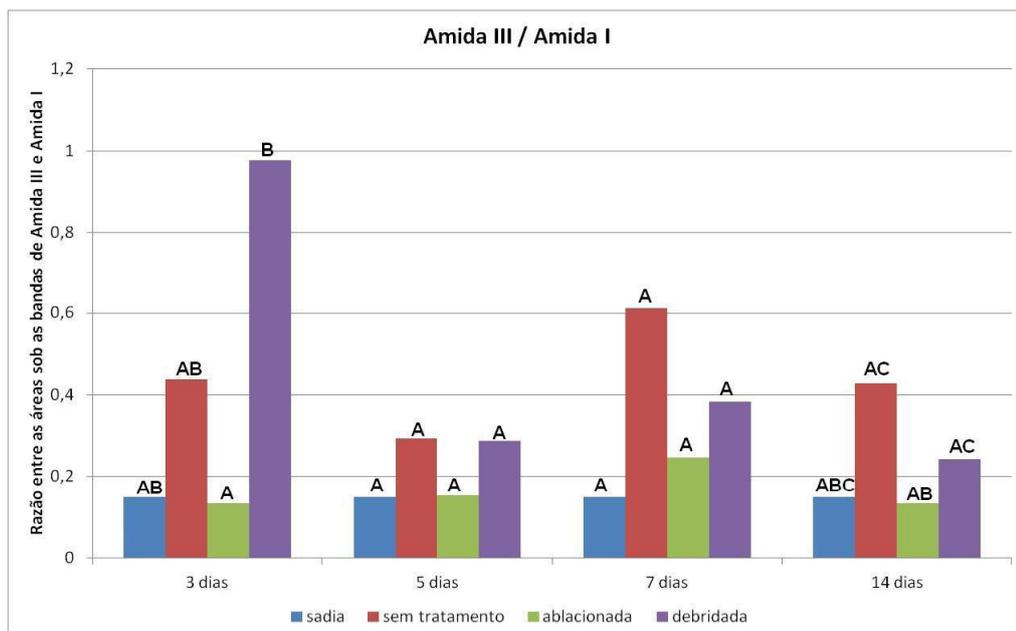


FIGURA 35 - Razão entre as áreas sob as bandas de Amida III e Amida I, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.

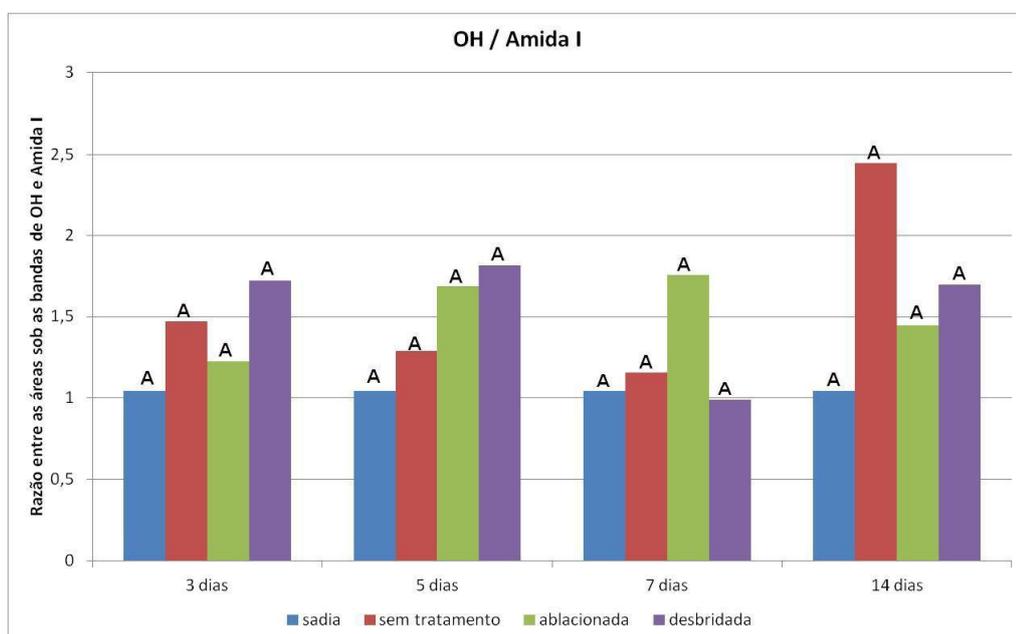


FIGURA 36 - Razão entre as áreas sob as bandas de OH e Amida I, dos diferentes grupos de acordo com cada tratamento.

4.5. Caracterização das amostras por microscopia não-linear

4.5.1. Pele sadia

As técnicas de TPEFM e SHG mostram-se como poderosas ferramentas investigar os componentes das células e da matriz extracelular. As técnicas possuem funcionamentos diferentes, mas completam-se na investigação da morfologia da pele.

Devido a sua estrutura, o colágeno é considerado um efetivo gerador de sinais de segundo harmônico, permitindo o uso da técnica de SHG⁵⁴, para o estudo da distribuição e degradação de colágeno no tecido. Uma vez que o colágeno possui susceptibilidade não-linear de segunda ordem elevada, esta observação permite que seja quantificado seu grau de orientação no tecido. O colágeno para a técnica de autofluorescência não gera nenhum sinal, sendo esta técnica utilizada para a visualização dos componentes da matriz extracelular, elastina e queratina dos folículos pilosos presentes no tecido. A elastina garante a restauração da forma do tecido quando submetido a forças de contração e estiramento. A elastina é conhecida por ser efetiva na geração de sinais de autofluorescência⁵⁵. As imagens obtidas pelas técnicas nos permitem visualizar componentes distintos do tecido, porém fornecendo informações complementares para o estudo.

Para nosso estudo, os tecidos foram obtidos conforme o método descrito na seção 3.3.3. Imagens de áreas selecionadas na região dérmica foram tomadas pela técnica de autofluorescência e SHG, como mostrado na FIGURA 37. As amostras foram excitadas com comprimento de onda centrado em 950 nm e o sinal emitido foi coletado em 485 nm para o sinal de SHG e na faixa de 520 nm a 560 nm para o sinal emitido de autofluorescência.

Em (A) o colágeno presente na derme foi colorido em vermelho. As regiões escuras na imagem são estruturas que não geram sinal de segundo harmônico. A queratina, a elastina e outros componentes da matriz extracelular são visualizados em (B). A elastina mais o feixe de fibrilas de colágeno formam uma rede que fornece sustentação e elasticidade para o tecido⁵⁶. Uma sobreposição dos sinais gerados por SHG e autofluorescência, transmitidos e refletidos, são mostrados em (C). Pela sobreposição observamos que as regiões escuras da imagem de SHG são preenchidas pelo sinal de autofluorescência dos cromóforos endógenos presentes na derme. As imagens dos sinais

refletidos obtidos pelas técnicas não são mostrados na FIGURA, sendo mostrados somente os sinais transmitidos que possuem maior intensidade.

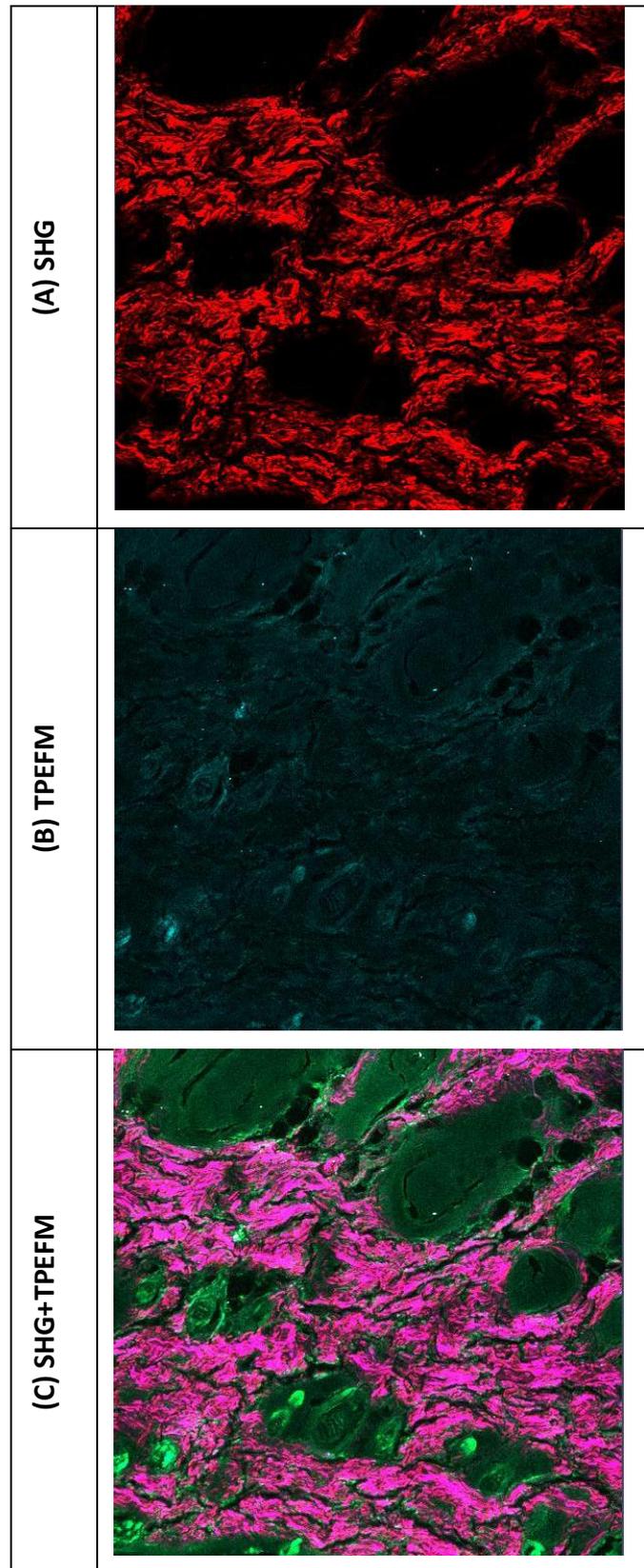


FIGURA 37 - Imagens representativas de seção perpendicular da derme de pele sadia com espessura do corte de 20 μm . A amostra foi excitada com comprimento de onda centrado em 940 nm. (A) Imagem de SHG transmitido da região da derme; aumento de 40x. (B) Imagem de TPEFM com filtro de emissão na faixa de 520 a 560 nm; aumento de 40x. (C) Sobreposição das imagens de SHG e TPEFM nos modos transmitido e refletido; ; aumento de 40x. Barra de escala: (—)= 100 μm .

4.5.2. Pele queimada

A avaliação precisa da extensão lesionada da pele é de grande importância para o clínico remover o tecido queimado e conduzir o processo de recuperação. Por conseguinte, o desenvolvimento de uma técnica minimamente invasiva capaz de monitorar a extensão do dano térmico da pele é muito valiosa para clínica dermatológica.

A queimadura de terceiro grau é caracterizada por atingir toda a camada da derme, podendo ainda atingir o tecido muscular. A exposição da pele a uma fonte de calor por longo período causa o rompimento das fibras de colágeno afetando a sua organização na derme, a destruição de apêndices dérmicos, assim como a necrose do epitélio⁵⁷.

No processo de cicatrização, a matriz extracelular regula a proliferação e diferenciação celular, através do colágeno, elastina e glicoproteínas, que formam uma trama que auxilia no suporte mecânico do tecido para poder regenerar-se.

Na caracterização das queimaduras, selecionamos áreas na região dérmica para aquisição de imagens de SHG e autofluorescência, como mostrado na FIGURA 38. Na FIGURA, as linhas representam o dia de sacrifício, e as colunas representam a técnica de aquisição da imagem. A coluna (A) representa o segundo harmônico gerado pelas fibras de colágeno do tecido. O colágeno apresenta-se em pouca quantidade no campo no 3º dia de análise, evoluindo a intensidade do sinal gerado ao longo do tempo.

Na análise das imagens de autofluorescência da coluna (B), observamos no 3º dia cortes transversais de folículos pilosos, proveniente da queratina da haste do pelo. Na imagem observamos estruturas ovais escuras que seriam os adipócitos, os quais não possuem emissão detectável pela técnica. Na imagem do 5º dia, a intensidade do sinal de autofluorescência é menor que no 3º dia, porém é possível observar uma diminuição no campo de folículos pilosos em corte transversal e uma maior homogeneidade da derme. O 7º dia apresenta pontos destacados na imagem, provenientes da queratina da haste dos folículos pilosos. No 14º dia de análise, não observamos nenhuma estrutura na derme, dando o aspecto de uniformidade a camada e de quase regeneração.

A sobreposição das imagens de SHG e TPEFM é mostrada na coluna (C). As imagens mostram o colágeno circundando os folículos pilosos em todos os dias de análise, sendo exceção o 14º dia, onde não foi observado estrutura na camada. As

imagens possuem mais intensidade de sinal devido a sobreposição dos sinais refletido e transmitido emitidos da amostra.

Monitorando o processo de cicatrização, podemos notar a distribuição e os componentes da matriz extracelular (MEC). Observamos que os componentes da MEC aparecem menos distribuídos no início do processo, aumentando sua distribuição com o tempo. Isso pode ser devido aos fibroblastos que restauram a estabilidade mecânica do tecido conjuntivo na lesão, produzindo colágeno, elastina e proteoglicanas^{1,58}. A estrutura morfológica do colágeno é alterada, como podemos observar pela FIGURA 38, esse colágeno desenvolve um papel importante na pele, no tecido intersticial e na lâmina basal, e sua síntese é importante na fase proliferativa do processo de cicatrização e marca o início da renovação estrutural do tecido.

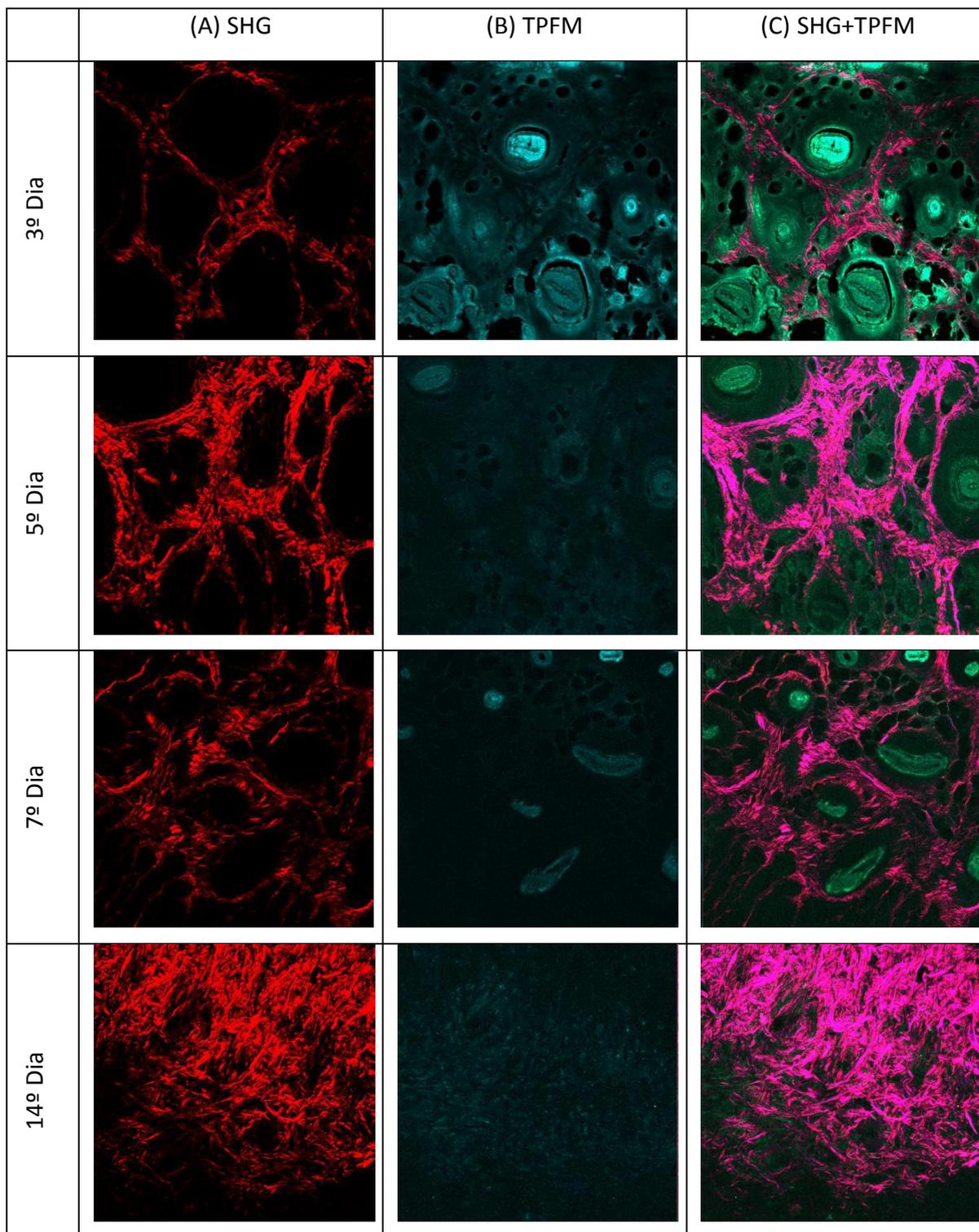


FIGURA 38 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada, com espessura de 20 μ m. As colunas representam as técnicas de microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise. Barra de escala: (—)= 100 μ m.

4.5.3. Pele queimada e tratada por desbridamento

O desbridamento da lesão é um processo que possibilita a avaliação adequada da base da lesão e facilita a cicatrização. A remoção do tecido queimado e necrosado ajuda a realizar as contagens bacterianas da região da lesão⁴. A remoção completa da base da ferida permite a avaliação dos sinais de infecção da lesão e outras alterações significativas das condições de cicatrização. Efetuado o processo de limpeza, as características da lesão são semelhantes as observadas na seção 4.5.2.

As imagens de SHG na FIGURA 39, corroboram para os aspectos descritos na caracterização do tecido queimado. No estudo das imagens, foi encontrado degradação do colágeno no terceiro dia, característica que ainda estava presente no quinto dia de acompanhamento. No sétimo dia ocorreu o aumento na síntese do colágeno, caracterizado pela sua maior presença no campo da imagem. No décimo quarto dia o colágeno foi encontrado mais concentrado no campo, havendo mais fibras para contribuir na geração do segundo harmônico.

O acompanhamento da deposição de componentes da matriz extracelular e da queratina presente na derme foi observado pelas imagens de autofluorescência. No terceiro dia, foi observado a presença de adipócitos afastados da região subdérmica e espalhados pelo campo da imagem, representados pelos círculos escuros. No quinto dia ocorreu uma redução dos adipócitos por campo e uma uniformização da derme. A presença de queratina foi observada no sétimo dia, através dos cortes transversais de folículos pilosos. No décimo quarto dia, as imagens não tiveram uma qualidade satisfatória, mas foi observado mais uniformidade no tecido, porém com a presença de alguns adipócitos por campo.

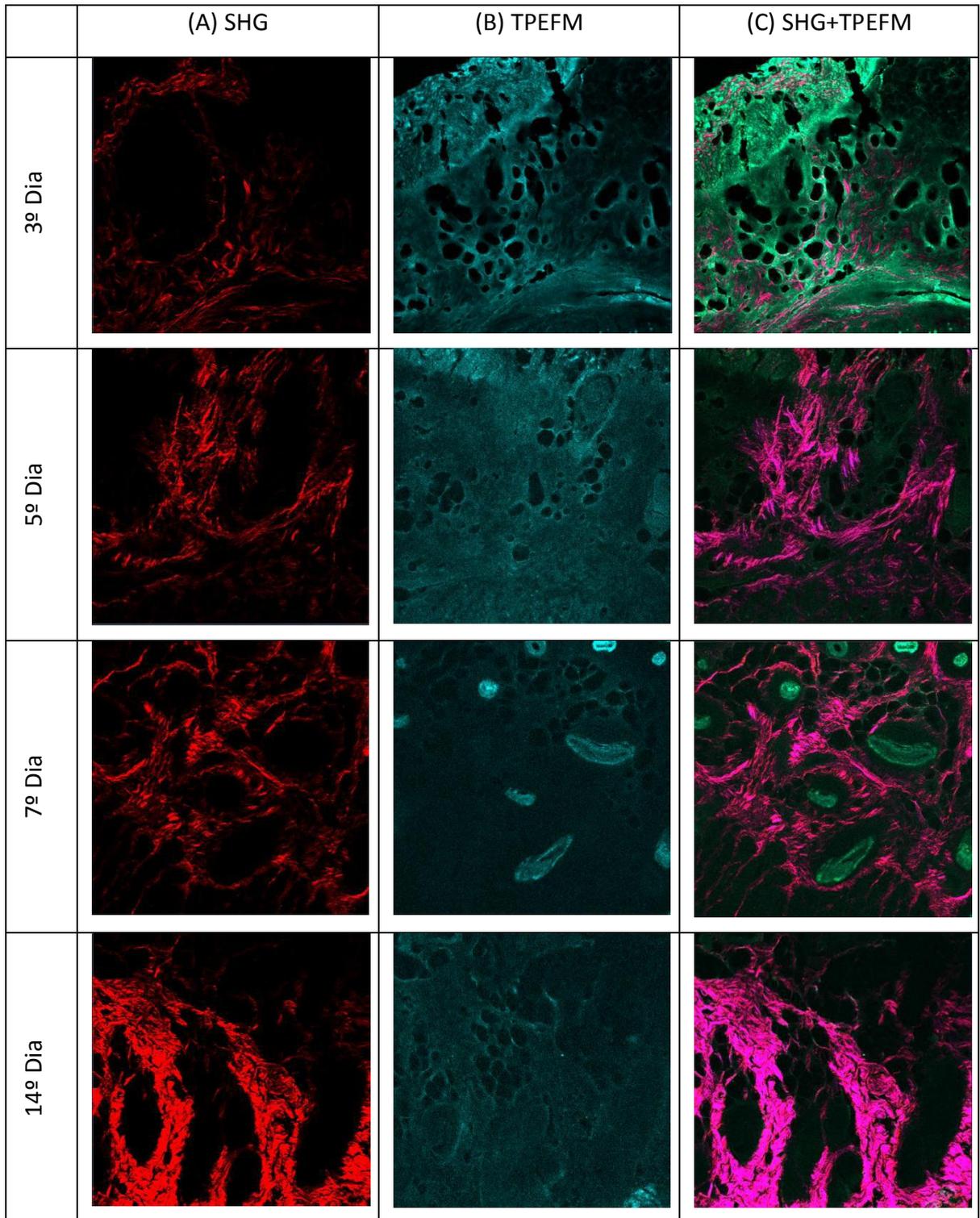


FIGURA 39 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada e tratada por desbridamento, com espessura de 20 μ m. As colunas representam as técnicas de microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise; aumento 40x. Barra de escala: (—)= 100 μ m.

4.5.4. Pele queimada e tratada por ablação

O uso de lasers para a remoção de tecido queimado e necrosado é pouco estudado na literatura⁵⁹. Lasers pulsados produzem ablação do tecido de forma eficiente e precisa com danos residuais térmicos reduzidos

A FIGURA 40 FIGURA 40 mostra a intensidade dos sinais obtidos pelas técnicas TPEFM/SHG de amostra de pele queimada e submetida a ablação laser. Em (A) a estrutura morfológica do colágeno apresenta a mesma degradação observada para a amostra queimada, indicando que a energia utilizada para ablação, não causou mais efeitos deletérios ao colágeno presente na derme. No quinto dia o colágeno possui baixa regeneração, assemelhando-se ao observado no terceiro dia. O sétimo dia é caracterizado pela presença de mais fibras de colágeno, contribuindo para a geração de segundo harmônico. No décimo quarto dia as fibras de colágeno apresentam grande contribuição para o sinal, porém foi observado um espaçamento interfibrilar.

A imagem capturada por autofluorescência (B) apresenta no terceiro dia a presença de adipócitos fora da região subdérmica, que na imagem são mostrados como círculos escuros. Pelo corte, a queratina da haste do folículos pilosos em corte transversal, estão contribuindo para a autofluorescência. Nas imagens do quinto e sétimo dia, não foi possível definir com clareza as estruturas presentes na derme. No sétimo dia, foi possível observar a presença de autofluorescência proveniente de queratina, dos cortes transversais de folículos pilosos. No décimo quarto dia a derme apresenta uniformidade na imagem, não sendo possível observar estruturas na camada. Acredita-se que no décimo quarto dia o sinal proveniente da derme foi devido a matriz colágena secretada pelos fibroblastos do tecido conjuntivo.

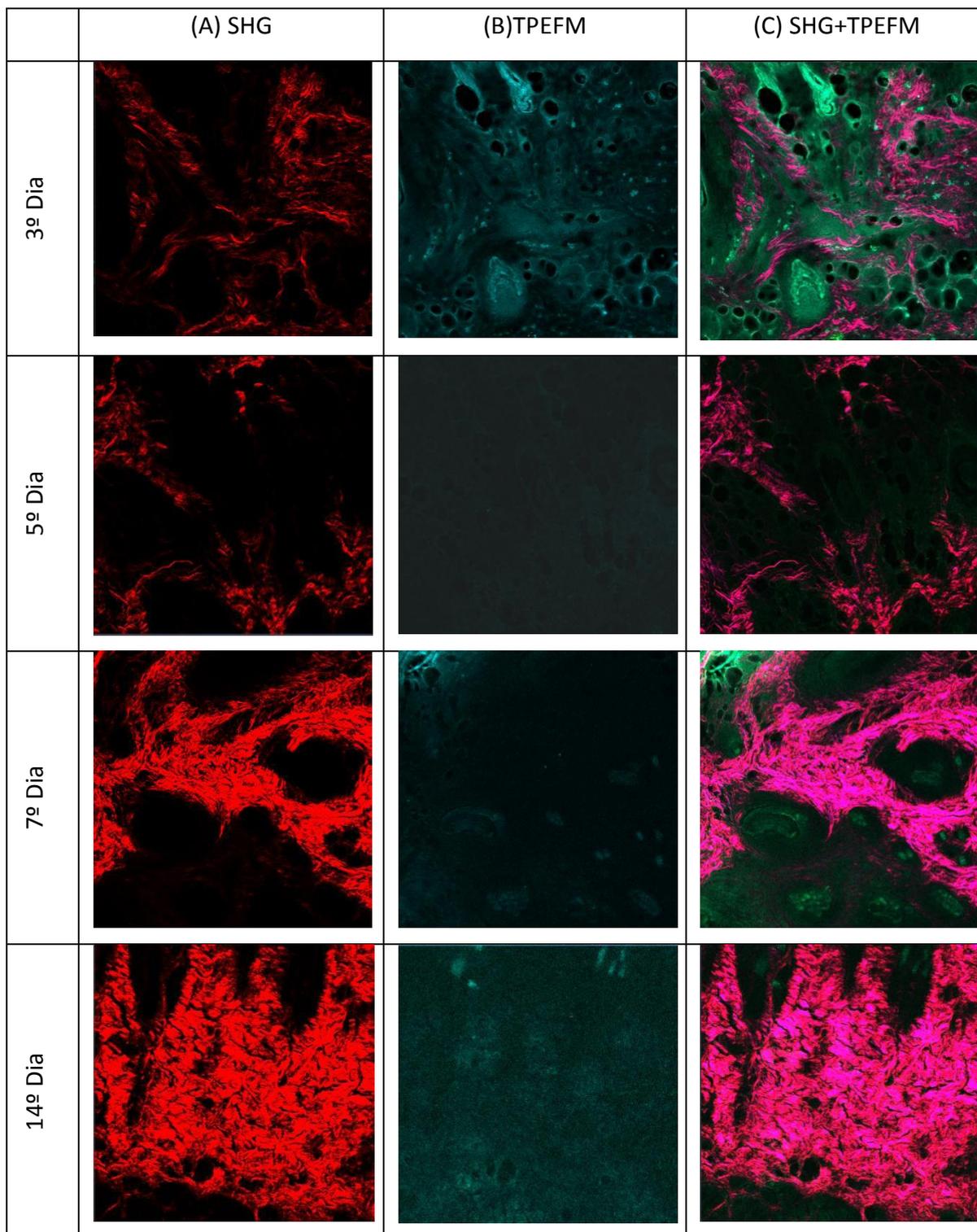


FIGURA 40 - Imagens de SHG e TPEFM de cortes transversais de pele queimada e tratada por desbridamento, com espessura de 20 μ m. As colunas representam as técnicas de microscopia não-linear, sendo a ultima uma sobreposição das técnicas; nas linhas observamos os dias de análise; aumento 40x. Barra de escala: (—)= 100 μ m..

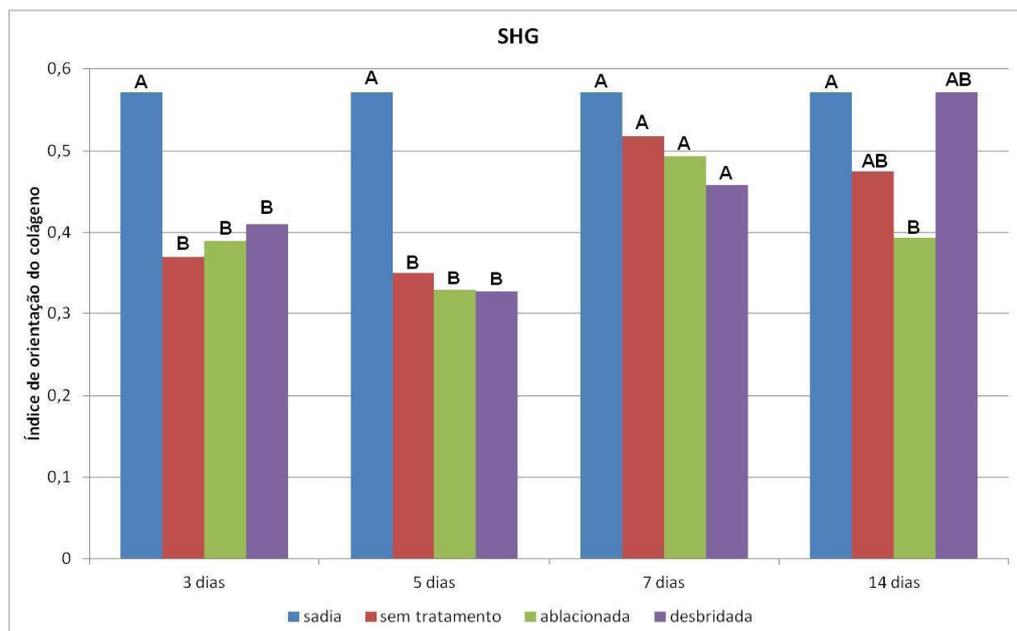


FIGURA 41 - Índice de orientação do colágeno das amostras de pele queimada e submetidas a tratamento durante o processo de acompanhamento da cicatrização.

Analisando as imagens obtidas de SHG das amostras de pele queimada e submetidas a tratamento, observamos que a orientação do colágeno, mostrado na FIGURA 41, possui uma curva de comportamento igual para ambas as amostras, durante o período de acompanhamento do processo de regeneração. O ponto de partida para todas as amostras foi a pele sadia, nossa referência no estudo. No terceiro dia, foi observado que a orientação do colágeno torna-se mais aleatória pelo gráfico. Esta fase da cicatrização não é marcada por uma regeneração do colágeno da derme. A característica dessa fase é a homeostase, coagulação, ativação da resposta imune local, fagocitose e migração celular⁶⁰. A fase inflamatória pode durar mais de três dias, dependendo da severidade da lesão. Para o nosso caso, onde as lesões atingiram a região muscular, a fase inflamatória torna-se mais longa, conforme observado pelo gráfico no quinto dia onde a orientação do colágeno permanece praticamente inalterada. Uma vez garantida as condições locais da lesão para que ocorra a reconstrução vascular e o seu preenchimento por meio do tecido de granulação inicia-se a fase proliferativa. Nesta fase a derme subjacente se contrai trazendo as margens da lesão uma para perto da outra. Estimulados pelos níveis locais de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e de fator de crescimento transformante- β , os fibroblastos começam a proliferar e se infiltrar no

coágulo sanguíneo, depositando colágeno do tipo III e outros componentes da matriz extracelular^{39,56,61,62}.

A fase proliferativa é descrita no gráfico como o pico de orientação do colágeno no sétimo dia. Após o pico de proliferação do colágeno, ocorre a maturação das fibras e a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, causando contração da lesão e o fechamento. Pelo gráfico a maturação pode ser descrita pela queda na curva de orientação do colágeno do décimo quarto. Analisando a sobreposição das imagens de SHG e TPEFM, não foi observado apêndices dérmicos na região da lesão, o que indicaria que mesmo a lesão estando fechada, a regeneração subdérmica ainda não estava completa.

CAPÍTULO 5

5. Conclusões

Entre os parâmetros estudados, a energia de 10 μJ /pulso (cerca de 90 femtossegundos de largura temporal e 2 kHz de taxa de repetição) utilizada foi suficiente para remoção controlada de *debris* de tecido queimado para promoção da cicatrização. Esta condição resultou na profundidade de remoção de tecido de cerca de 170 μm por irradiação, tendo sido considerado recomendável cinco repetições para remoção completa do *debris*.

O acompanhamento do processo de cicatrização por meio da histologia, mostrou que nas três condições de estudo o tecido apresentou regeneração, porém sem atingir suas características morfológicas iniciais. As imagens histológicas não apresentam apêndices dérmicos no décimo quarto dia. Comparativamente o epitélio e a derme dos dois tratamentos (desbridamento cirúrgico e ablação por laser de femtossegundos) assemelham-se, porém o grupo ablacionado possui mais vasos sanguíneos.

Analisando-se as áreas sob cada banda de absorção de interesse do espectro no infravermelho, observamos na comparação entre os tratamentos ao longo do período de cicatrização, não apresentaram diferença significativa na variação da quantidade de proteínas e hidratação da camada da derme.

As imagens de microscopia não-linear permitiram uma compreensão dos estados fisiológicos e morfológicos do tecido. Analisando as imagens ao longo do período de acompanhamento do processo de cicatrização, observamos que o colágeno que foi degradado pelo aumento de temperatura, foi regenerado ao longo do tempo, conforme indicado pela quantidade de colágeno nas imagens. A autofluorescência observada permitiu avaliar a regeneração morfológica do tecido, e estabelecer hipóteses baseadas na banda de emissão coletada pelo microscópio, sobre quais cromóforos contribuíram para a fluorescência. Em todas as amostras, foi observada fluorescência emitida devido a queratina, elastina e glicoproteínas presentes na derme. Apenas no sétimo dia o índice de orientação do colágeno não permitiu observar as diferenças entre os tratamentos. Após

14 dias, para os dois tratamentos, as fibras de colágeno ainda não atingiram a mesma organização das fibras presentes na pele sadia.

Analisando o coeficiente de atenuação total do tecido relativamente à pele sadia de cada amostra por meio das imagens tomográficas de OCT, foi possível observar que no décimo quarto dia, a curva de regeneração mostrou que a propriedade óptica do tecido ablacionado a laser converge para os valores iniciais, isto é, mais próxima de uma pele sadia. Já as amostras sem tratamento e tratadas por desbridamento convergiram para valores ainda distantes da pele normal.

Neste estudo foi possível avaliar a viabilidade do uso de lasers de femtossegundos de altíssima intensidade como coadjuvante no tratamento de pacientes queimados por meio de um modelo *in vivo*.

CAPITULO 6

6. Perspectivas e proposições

Acreditamos que o estudo dos parâmetros confocais do feixe laser na amostra, ajudarão a uniformizar a remoção do tecido necrosado possibilitando otimizar a sua cicatrização. O estudo *in vitro* de amostras de pele queimada e submetida a tratamento, utilizando a técnica de OCT, possibilitará quantificar o índice de refração do tecido, e acompanhar a sua regeneração por meio da propriedade óptica. A análise superficial do tecido, por meio de imagem espectral no infravermelho, permitirá o enriquecimento do estudo da distribuição dos compostos bioquímicos presentes no tecido queimado e tratado nas suas diferentes fases de regeneração.

7. Referências

- ¹ GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**, 2.ed. São Paulo - SP. Ed. Guanabara Koogan 2003.
- ² SUN, X.; WEEKS, B. S.; XIAO, M.; et al. **Burns Regenerative Medicine and Therapy**, Ed. Karger, 2004;
- ³ STEED, L. D. Debridement. **The American Journal of Surgery**, V.187, p71S – 74S, 2004;
- ⁴ BISHARA, S. A.; GUNN, S. W.; HAYEK, S. N.. State of art in burn treatment. **World Journal of Surgery**, V.29, p.131–148, 2005;
- ⁵ BRUNICARDI, F.; ANDERSEN, D.; BILLIAR, T.; POLLOCK, R. E. ET AL. **Schwartz's Principles of Surgery**. Cap. 7, 9. ed., New York, NY, McGraw-Hill Professional, 2009.
- ⁶ ATIYEH, B. S.; GUNN, S. W.; HAYEK, S. N.. State of the art in burn treatment. **World Journal of Surgery**, V.29, 131–148, 2005.
- ⁷ WANG, T. H.; MA, H.; YEH, F. L.; LIN, J.T.; SHEN, B. H. The use of "composite dressing" for covering split-thickness skin graft donor sites. **Burns**, V.36(2), p252-255, 2010.
- ⁸ EIVSON, D.; BROWN, R.F.R.; RICE, P. The treatment of sulphur mustard burns with laser debridement. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. V.59, p1087-1096, 2006.
- ⁹ YASUI, T; TOHNO, Y.; ARAKI, T. Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second harmonic generation polarimetry. **J. Biomed. Opt.** v.9, 2, p259-264, 2004;
- ¹⁰ HELMCHEN, F; DENK, W. Deep tissue two-photon microscopy. **Nature methods**. v.2, 12, 2005.
- ¹¹ ZHUO, S.; CHEN, J.; LUO, T.; ZOU, D. Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multichannel mode and Lambda mode. **Optics Express**. v.14, 17, 2006.
- ¹² P.P. PRONKO; P. VANROMPAY; A. HORVATH; C.F. LOESEL; T. JUHASZ; X. LIU; G. MOUROU. Avalanche ionization and dielectric breakdown in silicon with ultrafast laser pulses. **Physics Review B**, v 58, pp. 2387-2390, 2008.
- ¹³ J. C. SCOTT, B. PETER, C. THOMAS, S. XIAO-AN, K. PAUL. Recent Progress On Laser-Induced Modifications And Intrinsic Bulk Damage Of Wide-Gap Optical Materials. **Optical Engineering**. V.28(10), 1989.
- ¹⁴ S. M. SZE et al. **Physics of Semiconductor Devices**. Willey-Interscience, 3ª edição, 2006.

-
- ¹⁵ B. C. STUART, M. D. FEIT, S. HERMAN, A. M. RUBENCHIK, B. W. SHORE, M. D. PERRY. Optical ablation by high-power short-pulse lasers. **Journal of Optical Society of American – B**. V. 13(2), pp. 459-468, 1996.
- ¹⁶ E. YABLONOVITCH E N. BLOEMBERGEN. Avalanche ionization and the limiting diameter of filaments induced by light pulses in transparent media. **Physical Review Letters**. V.29(14). pp. 907–910. 1972.
- ¹⁷ C.C. HOMES, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, **Condensed Matter Physics & Materials Science Department Brookhaven National Laboratory – Lectures Notes**, 2011.
- ¹⁸ PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M. **Introduction of spectroscopy**, 3ed. Thomson Learning, 2011;
- ¹⁹ FRANCIS M. MIRABELLA, Principles, Theory and Practice of Internal Reflection Spectroscopy, **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, 2006.
- ²⁰ R. W. BOYD. **Nonlinear Optics**, Academic Press. 3^a Ed., 2008.
- ²¹ D. MAZZA, P. BIANCHINI, V. CAORSI, F. CELLA, P. P. MONDALET AL, Non-Linear Microscopy, Biological and Medical Physics, **Biomedical Engineering**, V.47-69, 2008.
- ²² AIKATERINI ZOUMI, ALVIN YEH, et al, Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence, **Proceedings of National Academy of Science**, v.99(17), 2002.
- ²³ LAKOWICZ, J. R.; GRZYCZYNSKI, I. **Topicos de Espectroscopia de Fluorescência V 1**, Ed. Plenum Press 1991.
- ²⁴ SO, P.T. C., DONG, C.Y. et al, Two photon Excitation Fluorescence Microscopy. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v02:399–429, 2000.
- ²⁵ S.W. HELL, Nonlinear optical microscopy, **Bioimaging**, V.4 pp. 121–123, 1996.
- ²⁶ P H TOMLINS AND R K WANG, Theory, developments and applications of optical coherence tomography **Journal of Physics D: Applied Physics**, 38 2519, 2005.
- ²⁷ A F FERCHER, , W DREXLER, C K HITZENBERGER T LASSER, Optical coherence tomography—principles and applications, **Reports on Progress Physics**, V.66 239–303, 2003.
- ²⁸ J. G. FUJIMOTO, Optical Coherence Tomography: Principles and Applications, **The Laser Society of Japan**, 2005.
- ²⁹ IK-KYUNG JANG, BRETT E. BOUMA, DONG-HEON KANG, et al, Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound, **Journal of American College of Cardiology**, V.39(4):604-609, 2002.
- ³⁰ P. F. ESCOBAR, J. L. BELINSON, A. WHITE Diagnostic efficacy of optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive cancer of uterine cervix and vulva, **International Journal of Gynecological Cancer**, v14, 3, p 470–474, 2004.

-
- ³¹ XIAO-JUN WANG, THOMAS E. MILNER, JOHANNES F. DE BOER, YI ZHANG, DAVID H. PASHLEY, AND J. STUART NELSON, Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography, **Applied Optics**, V. 38, No. 10 y 1. 1999.
- ³² FREITAS, A. Z. **Caracterização de Tecidos Biológicos através de Tomografia por Coerência Óptica**. 2007. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ³³ BOUMA, E. B.; TEARNEY, G. J. **Handbook of optical coherence tomography**. New York, N.Y: Marcel Dekker, 2002.
- ³⁴ FERCHER, A.F.; DREXTER, W.; HITZENBERGER, C.K.; LASSER, T. Optical coherence tomography – principles and applications. **Report on Progress in Physics**, v. 66, p.239-303, 2003.
- ³⁵ RAELE, M.P. **Desenvolvimento de um sistema de tomografia por coerência óptica no domínio de Fourier sensível á polarização e sua utilização na determinação das matrizes de Mueller**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ³⁶ BAYAT, M.; VASHEGHANI, M. M.; RAZAVI, N.; TAHERI, S.; RAKHSHAN, M. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.83, p87-93, 2006.
- ³⁷ VAN ZUIJLEN, P. P.; RUURDA, J. J.; VAN VEEN, H., A.; VAN MARLE, J.; VAN TRIER, A., J.; GROENEVELT, F.; KREIS, R.,W.; MIDDELKOOP, E., Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints, **Burns**, V.29, p.423-431 2003.
- ³⁸ ZHU X; ZHUO S; ZHENG L; LU K; JIANG X; CHEN J; LIN B., Quantified characterization of human cutaneous normal scar using multiphoton microscopy, **Journal of Biophotonics**, 3(1-2), 108-116, 2010.
- ³⁹ ELDER, D. E.; JOHNSON, B.; ELENITSAS, R. et al. **Lever's Histopathology of the Skin**. Cap. 13. 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- ⁴⁰ COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Cap. 22. 6 ed. Saunders, 1999.
- ⁴¹ MATTOX, K. L., FELICIANO, D. V. MOORE, E. E., **Trauma**, 4ª Edição, Editora Revinter, 2005.
- ⁴² FURUYA, D. T., POLETTO, A. C., FAVARO, R. R., MARTINS, J. O., ZORN, T. M., MACHADO, U. F., Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism**, V.59(3),p.395-9, 2010.
- ⁴³ CANCELLO, R, HENEGAR, C, VIGUERIE, N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**. p.54:2277–2286, 2005.

-
- ⁴⁴ HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L., SPIEGELMAN, B. M., Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor–alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, p.95:2409–2415, 1995.
- ⁴⁵ HUANG, D.; SWANSON, E. A.; LIN, C.P.; SCHUMAN, J.S.; STINSON, W.G.; CHANG, W.; HEE, M.R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C.A.; FUJIMOTO, J.G.. **Optical coherence tomography. Science**. 254, 1178-1181, 1991.
- ⁴⁶ VAN VELTHOVENA, M. E. J.; FABERB, D. J.; VERBRAAKA, F. D.; VAN LEEUWENB, T. G.; DE SMET, M. D.. Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**. v26, p.57–77, 2007.
- ⁴⁷ NASSIF, N.; CENSE, B.; PARK, B.H.; YUN, S.H.; CHEN, T.C.; BOUMA, B.E.; TEARNEY, G.J.; DE BOER, J.F. In vivo human retinal imaging by ultrahigh-speed spectral domain optical coherence tomography. **Optical Letters**, 29, p.480-482, 2004.
- ⁴⁸ ISHIDA, S., NISHIZAWA, N., Quantitative comparison of contrast and imaging depth of ultrahigh-resolution optical coherence tomography images in 800 - 1700 nm wavelength region, **Biomedical Optics Express**, v.e, (2), 2012.
- ⁴⁹ Alberts, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D., **Molecular Biology of the Cell**, Garland Press: New York, 1994.
- ⁵⁰ PARRY, D. A. D.; CRAIG, A. S. **In Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix**, Ruggeri, A., Motta, P. M. Eds., Martinus Nijhoff Publishers, p.34, 1984.
- ⁵¹ CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P. **Organic Chemistry**, OUP Oxford, 2001.
- ⁵² POTTS, R. O., GUZEK, D. B., HARRIS, R. R. E MCKIE, J. E., A noninvasive, *in vivo* technique to quantitatively measure water concentration of the stratum corneum using attenuated total-reflectance infrared spectroscopy, **Archive of. Dermatology**, v.277, 489–495, 1985.
- ⁵³ LUCASSEN, G. W., VAN VEEN, G. N. A., JANSEN, J. A. J., Band Analysis of Hydrated Human Skin Stratum Corneum Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectra *In Vivo*, **Journal of Biomedical. Optics**, 3, 267, 1998.
- ⁵⁴ BIANCHINI, P.; DIASPRO, A.. Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. **Journal of Biophotonics**. 1, No. 6, 443–450, 2008.
- ⁵⁵ SHUANGMU ZHUO, JIANXIN CHEN, TIANSHU LUO, AND DINGSONG ZOU. Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multichannel mode and Lambda mode. **21 Optics Express**. Vol. 14, No. 17, 2006;
- ⁵⁶ KIERSZENBAUM, A. L., **Histologia e Biologia Celular**, 2ª Edição, Elsevier, 2008

-
- ⁵⁷ Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., Chapman, J. A., Collagen fibril formation, **Biochemical Journal**, 316 p. 1-11, 1996;
- ⁵⁸ ROUMEN PANKOV AND KENNETH M. YAMADA, Fibronectin at a glance, **Journal of Cell Science** 115, 3861-3863, 2002.
- ⁵⁹ GREEN, H. A., DOMANKEVITZ, Y., NISHIOKA, N. S., Pulsed carbon dioxide laser ablation of burned skin: in vitro and in vivo analysis. **Lasers in Surgery and Medicine**, 10(5):476-84, 1990.
- ⁶⁰ DIEGELMANN, R. F., EVANS, M. C., Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing . **Frontiers in Bioscience**, p.283-289, 2004.
- ⁶¹ SUGAYAMA, S. T. ; NOGUEIRA, G. E. C., FRANÇA, C. M., PRATES, R. A.,SILVIA, D. F. T., NUNEZ, S. C., RIBEIRO, M. S., Angiogenesis induced by low-intensity laser therapy: comparative study between single and fractioned dose on burn healing. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**, v. 6846, p. 6840D1-6846D6, 2008.
- ⁶² NISSEN, N. N., POLVERINI, P. J., KOCH, A. E. et al, Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Angiogenic Activity during the Proliferative Phase of Wound Healing, **American Journal of Pathology**, v.52, 6, 1998;