

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica
Universidade Regional Comunitária de Chapecó
Mestrado Interinstitucional em Engenharia Biomédica**

JOÃO ARTUR ETZ JÚNIOR

**AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO
DE RE-EPITELIZAÇÃO CORNEANA**

São José dos Campos
2009

JOÃO ARTUR ETZ JÚNIOR

“Ação do laser de baixa potência no processo de re-epitelização corneana”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, dentro do curso de Mestrado Interinstitucional Univap/Unochapecó.

Orientadores: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro
Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos
2009

E86a

Etz Júnior, João Artur

Ação do laser de baixa potência no processo de re-epitelização corneana / João Artur Etz Júnior; Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, Prof. Dr. Newton Soares da Silva. -- São José dos Campos; Chapecó, 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, modalidade Minter Univap / Unochapecó. 2008.

1. Laser de Baixa intensidade 2. Córnea 3. Cicatrização de feridas I. Zangaro, Renato Amaro, orientador. II. Silva, Newton Soares da, orient. III. Título

CDU: 617.713

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicas e científicos, a reprodução total ou parcial dessa dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data:

09.02.2009

JOÃO ARTUR ETZ JUNIOR

**“AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO
DE RE-EPITELIZAÇÃO CORNEANA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **NELSON JOSÉ FREITAS DA SILVEIRA** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **RENATO AMARO ZÂNGARO** (UNICASTELO) _____

Prof. Dr. **MIGUEL ANGEL C. SALGADO** (UNESP) _____

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 09 de fevereiro de 2009.

Dedicatória

As pessoas que mais amo, minha esposa Patrícia e minhas filhas Camilly e Letícia, pelo apoio e compreensão pelos momentos que estive ausente

Agradeço a orientação, para a realização desse trabalho, dos professores doutores Renato Amaro Zângaro e Newton Sores da Silva.

Agradeço ao prof. Dr. Miguel Angel C. Salgado por acompanhar todo o processo de análise histológica e aos técnicos do laboratório de histologia da Unesp pelo preparo das lâminas.

Agradeço à Doutoranda Katia Calligaris Rodrigues pelas valiosas contribuições e orientações para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Dra. Janaína Duarte, pela contribuição pois sem ela nosso trabalho não andaria.

Agradeço a Neila pela importante ajuda como bioterista.

Aos colegas que sempre me apoiaram.

Teu olhar....

Ação do laser de baixa potência no processo de re-epitelização corneana

Resumo

A resposta cicatricial corneana, desencadeada por procedimentos refrativos com o objetivo de correção de ametropias (correção de erros de refração), representa um fator determinante para a eficácia do resultado final. Algumas complicações pós-operatórias como a hipocorreção, a hipercorreção, a exacerbação de processos inflamatórios e a formação de opacidades corneanas (haze), estão diretamente relacionadas a esse processo cicatricial. Por outro lado, a aplicação da Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) tem demonstrado resultados surpreendentes especialmente no reparo tecidual. Dessa forma, conhecer como se dá o processo de biomodulação, com laser de baixa potência, na reparação de córneas, passa a ter um atrativo especial na oftalmologia. Por isso, propôs-se nesse trabalho a avaliação da ação do laser de baixa potência, Arseneto de Gálio Alunínio (AsGaAl), com comprimento de onda em 650nm, sobre o processo de reparação epitelial da córnea de coelhos (Nova Zelândia). A fim de verificar o nível de epitelização clínica foi realizada uma avaliação morfométrica com a ajuda do programa Leica Q-win, com acompanhamento durante todo o processo de tratamento com Laser. Após o término do tratamento, uma análise histomorfométrica permitiu avaliar o processo de re-epitelização das córneas. O presente trabalho mostrou que a ação do Laser de baixa potência de 650 nm e fluência de 1,5 J/cm² não apresentou diferença significativa na aceleração do processo de reparo tecidual do epitélio da córnea. Da mesma forma, ele não apresentou efeito inibitório do reparo tecidual, o que foi observado a partir da investigação realizada com a análise histomorfológica e histomorfométrica.

Palavras-chave: fotobioestimulação, cicatrização corneana, Terapia com Laser de Baixa Potência

Low power laser action in the wound healing cornea process

Abstract

The corneal wound healing response, started by refractive surgical procedures to correct ametropia, it is a major determinant of efficacy of the results. Some post surgical complications as overcorrection, undercorrection, inflammatory procedures and corneal stroma opacification, are directly related to the healing process. On the other hand, the low power laser therapy has demonstrated amazing results in wound healing tissue. For ophthalmology is a special attractive to know how occurs the biomodulation process with low power laser therapy in the corneal wound healing. Therefore, the main of this work was to evaluate the action of the low power laser, semi-conductor diode AsGaAl laser, wavelength at 650 nm, in the wound healing process of New Zealand rabbit cornea. To verify the clinical healing a morphometrical evaluation was performed with Leica Q-Win Software, during all the laser treatment. After the end of treatment the corneal healing process was evaluated by a histomorphometrical analysis. The present work demonstrated that the 1,5 J/cm² low power laser action at 650 nm has no significantly contribution to faster or inhibitory corneal healing process by histomorphological an histomorphometrical analyses.

Key-words: fotobiostimulation, corneal healing, low power laser therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	pg
Figura 1 – Hierarquia da linhagem epitelial corneal	25
Figura 2 – Enucleação dos olhos dos animais	28
Figura 3 – Olho de coelho marcado para retirada do epitélio	29
Figura 4 – Coleta das imagens no estereoscópio	30
Figura 5 – Processo de irradiação com laser de baixa potência	32
Figura 6 – Fotomicrografia de córnea de coelho em lâmina teste com destaque para epitélio normal. H.E. Aumento de 5x em (a) e aumento de 20x em (b)	33
Figura 7– Fotomicrografia da córnea de coelho com epitélio neoformado corada com (a) HE e (b) Tricrômico de Mallory	33
Figura 8 – Imagens fotográficas da região desepitelizada marcada com fluoresceína para os tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h	35
Figura 9 – Reparação epitelial da córnea no experimento piloto	37
Figura 10 – Reparação epitelial da córnea	37
Figura 11 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Controle, período de 48 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) e (c) regeneração do epitélio na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x	38
Figura 12 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Irradiado, período de 48 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) e (c) regeneração do epitélio na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x	38
Figura 13 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Controle, período de 72 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) presença do epitélio neoformado na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x	39
Figura 14 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Irradiado, período de 72 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) presença do epitélio neoformado na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x	39
Figura 15 – Histomorfometria dos grupos controle e irradiado em 48h e 72h	41

LISTA DE TABELAS

	pg
Tabela 1 – Fatores de crescimento e citocinas com seus respectivos efeitos na regeneração e cicatrização epitelial da córnea	26
Tabela 2 – Período de tratamento dos animais por grupo e por experimento	31
Tabela 03 - Medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise clínica morfológica <i>in vivo</i>	35
Tabela 4 - Significância estatística das medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise clínica morfológica <i>in vivo</i>	36
Tabela 5 – Medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise histomorfométrica	40
Tabela 6 - Significância estatística das medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise histomorfométrica	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP - Fosfatase Alcalina

AMPc - Adenosina monofosfato-cíclico

AsGaAl - Arseneto de Gálio Alunínio

ATP – Adenosina Trifosfato

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

BMP - Proteína morfogenética óssea

BRDU - Bromodeoxiuridina

CAT - Célula amplificadora transitória

CDT - Células diferenciadas terminais

CG – Células germinativas

CPM - Células pós-mitóticas

GMPc - Guanosina monofosfato cíclico

EGF - Fator de crescimento epidérmico

HGF - Fator de crescimento do hepatócito

IGF - Fator de crescimento tipo-insulina

IGF-1 - Fator de crescimento tipo-insulina 1

IGFBP3 - Proteína carreadora dos fatores de crescimento tipo insulina 3

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IFN- γ - Interferon γ

KGF - Fator de crescimento neural

LASEK - Laser subepitelial keratomileusis

LASIK - Laser in situ keratomileusis

LIPUS - Ultrassom pulsado de baixa intensidade

LLLT - Low Level Laser Therapy

MMP-1 – Metalproteinases 1

MMP-2 – Metalproteinase 2

N-CAM - Molécula de adesão neural

PRK - Ceratectomia fotorefrativa

PDGF - fator de crescimento derivado da plaqueta

TGF- α = Fator transformante- α

TGF- β - Fator transformante β

TGF- β 1 - Fator transformante β 1

TIMP-2 Metalaproteinase 2

TLBP - Terapia com Laser de Baixa Potência

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

LISTA DE SÍMBOLOS

λ - comprimento de onda

J/cm^2 – Joules por centímetro quadrado

mW – miliWatts

cm - centímetro

mm – milímetros

μm – micrômetro

nm - nanômetros

g - grama

kg – quilograma

s - segundos

h - horas

μl - microlitros

mg/kg – miligrama por quilograma

ml/kg - mililitros por quilograma

% - percentual

SUMÁRIO

	Pg
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A fotobiomodulação	19
2.2 Aspectos Histológicos Epitélio da Córnea	22
2.2.1 Regeneração Epitelial da Córnea	23
2.2.2 Cicatrização Epitelial da Córnea	25
3 OBJETIVO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Experimento Animal	28
4.1.1 Desepitelização da córnea	29
4.1.2 Irradiação	31
4.1.3 Histologia	32
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A Comitê de Ética em Pesquisa	51

1 INTRODUÇÃO

O emprego do laser constitui-se em um dos recursos utilizados em cirurgias de córneas com o objetivo de correção de ametropias (correção de erros de refração). Com a ablação tecidual, induzida pela ação física do excimer laser sobre o estroma anterior da córnea, é possível corrigir erros refrativos pela remodelagem do contorno óptico da superfície anterior da córnea (CREDIE, 2007). Laser *in situ* keratomileusis (LASIK) representa atualmente a técnica cirúrgica mais empregada para a correção de ametropias. Clinicamente apresenta uma recuperação rápida da visão, com mínimo desconforto e maior reprodutibilidade do efeito refracional. A ceratectomia fotorefrativa (PRK) consiste na remoção mecânica da camada epitelial corneana, incluindo sua membrana basal, com subsequente fotodisrupção da membrana de Bowman e porção anterior do estroma corneano (NETTO *et.al.*, 2005). Laser subepitelial keratomileusis (LASEK) é considerada uma modificação da técnica PRK, onde é criado um retalho epitelial após a aplicação de solução alcoólica, o qual é reposicionado após a fotodisrupção do tecido estromal (VINCIGUERRA *et.al.*, 2003).

A resposta cicatricial corneana, desencadeada por esses procedimentos refrativos, representa um fator determinante para a eficácia do resultado final. Algumas complicações pós-operatórias como a hipocorreção, a hipercorreção, a exacerbação de processos inflamatórios e a formação de opacidades corneanas e Haze, estão diretamente relacionadas a esse processo cicatricial. Após o LASIK, a resposta cicatricial é geralmente mais branda, envolvendo menor ativação celular. Entretanto, em casos de complicações intra-operatórias, poderá haver uma reação cicatricial tipo fibrótica, com alta concentração de miofibroblastos, resultando na opacificação corneana. A resposta cicatricial observada após PRK é de modo geral um fenômeno intenso, resultando muitas vezes em hiper ou hipocorreção, regressão do efeito refrativo e principalmente opacificação corneana após correção de altas ametropias (NETTO *et.al.*, 2005). Estudos tem demonstrado que a cicatrização após LASEK pode resultar num lento e assimétrico processo de reepitelização, com maior risco de opacidade corneana e lenta recuperação da acuidade visual (ESPANA *et.al.*, 2003).

Por outro lado, a reparação tecidual, por ação do Laser de Baixa Potência, tem sido objeto de estudo desde as primeiras observações dos efeitos fotobioquímicos da radiação laser em tecidos biológicos na década de 70, na Hungria, particularmente em respeito a sua

influência na modulação de certos tipos de célula que participam do micro-ambiente da cicatrização (PUGLIESE *et.al.*,2003). A divergência entre a efetividade clínica e a falta de explicações científicas criou um certo ceticismo sobre a eficiência desse método. Isso não impediu, porém, a disseminação da técnica e sua utilização clínica uma vez que ficou evidente que a radiação laser apresenta a capacidade de alterar o metabolismo celular na ausência de aquecimento tecidual significativo. Denomina-se, este fenômeno, de biomodulação, que depende do comprimento de onda (λ) da radiação Laser, do modo de emissão e da dose empregada (KARU, 1987; BASFORD, 1995).

A partir de então esse fenômeno tem sido, de forma crescente, investigado e aplicado como ferramenta terapêutica na prática clínica buscando proporcionar, entre outros, o estímulo do processo de reparo tecidual. Pode-se dizer que os efeitos dessa modalidade, de forma diferente dos até então conhecidos e explorados efeitos destrutivos desse tipo de radiação, encontram-se relacionados à sua capacidade de, quando sob baixas densidades de potência e energia, modular a função celular. Denominou-se esse tipo de terapia, que utiliza a luz coerente e monocromática, como Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) ou Low Level Laser Therapy (LLLT). Atualmente, a TLBP é caracterizada por vários parâmetros, como potência entre 10^{-3} e 10^{-1} W, comprimento de onda entre 300 a 10.600 nm, tempo de irradiação entre 10 a 3000 s, densidade de potência da ordem de 10^{-2} a 10^0 W/cm² e dose entre 10^{-2} a 10^2 J/cm² (POSTEN *et. al.*, 2005).

Dessa forma, conhecer como se dá o processo de biomodulação, com laser de baixa potência, na reparação de córneas, passa a ter um atrativo especial na oftalmologia. Por isso, propôs-se neste trabalho a avaliação da ação do laser de baixa potência, Arseneto de Gálio Alunínio (AsGaAl), com comprimento de onda em 650nm, sobre o processo de reparação epitelial da córnea de coelhos (Nova Zelândia). A fim de verificar o diâmetro de epitelização corneana foi realizada uma avaliação clínica morfológica *in vivo* com a ajuda do programa Leica Q-win, com acompanhamento durante todo o tratamento com Laser. Após o término do tratamento, uma análise histomorfométrica permitiu avaliar o processo de re-epitelização das córneas.

A presente proposta de pesquisa procurou estabelecer algumas considerações iniciais sobre o efeito fotobiomodulador do laser de baixa potência, isto é, apresentam-se relevantes resultados obtidos, principalmente, no que tange aos processos de reparo tecidual e estímulo

na produção de colágeno e elastina. Pesquisas recentes, utilizando técnicas modernas de avaliação de DNA e proteínas também são apresentadas no intuito de buscar esclarecer a ação da TLBP. No mesmo ítem encontram-se os processos de reparo e cicatrização do epitélio da córnea.

Na seqüência encontra-se todo o procedimento metodológico desenvolvido durante essa pesquisa, descrito em detalhes. Os resultados obtidos na análise com o programa Leica Q-win e aqueles obtidos com a análise histomorfométrica são apresentados posteriormente. Na seqüência esses resultados são discutidos a luz das pesquisas recentes desenvolvidas na área. A conclusão final também é apresentada e esperamos ser um atrativo para novas e mais promissoras pesquisas na fotobiomodulação do epitélio corneano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em meados de 1965 a medicina passou a fazer uso da radiação Laser, principalmente nas áreas de oftamologia, oncologia, dermatologia e cirurgia plástica, que passaram a explorar as características foto-térmicas resultantes da interação da radiação com tecidos biológicos, quando utilizada em elevadas densidades de potência, direcionando seu uso aos procedimentos cirúrgicos ablativos e para foto-coagulação. (AMARAL, 2004)

Mais tarde, em 1968, a possibilidade da utilização da radiação Laser foi relatada pelo húngaro Endre Mester e colaboradores (1968) para a indução de efeitos bioestimulativos. Desde então inúmeros trabalhos têm sido feitos e verificou-se que a radiação Laser de baixa potência influencia diretamente os processos de crescimento celular, aumentando a proliferação e produção de colágeno e fibroblastos. Em pequenos animais processos de reparação tecidual e melhora em processos inflamatórios também tem sido amplamente reportados.

2.1 A fotobiomodulação

Entre os fenômenos que ocorrem devido a interação da radiação Laser com o tecido biológico encontra-se o espalhamento. O espalhamento caracteriza-se pelos sucessivos processos de reflexão e/ou refração dos fótons durante sua propagação pelo meio (AMARAL, 2004). A magnitude da reflexão está relacionada a fatores como o ângulo de incidência do feixe Laser, o comprimento de onda (λ) da radiação e o grau de homogeneidade dos tecidos biológicos que para a radiação apresenta-se como uma gama de centros espalhadores. Outro fenômeno resultante da interação da radiação Laser com o tecido biológico é a absorção, que se deve à presença de moléculas (cromóforos) capazes de absorver seletivamente os fótons presentes no feixe (SOBANKO; ALSTER, 2008). Os tecidos biológicos apresentam, além de baixo grau de homogeneidade, uma alta quantidade de moléculas absorventes, o que explica a alta magnitude dos fenômenos de espalhamento e absorção em relação à radiação laser (DIAMANTOPOULOS, 1994).

Em medicina, a utilização clínica da radiação Laser encontra fundamento nas alterações residuais desencadeadas pela absorção dos fótons presentes no feixe Laser. O tipo

de resposta induzida associa-se às características dosimétricas da radiação utilizada (comprimento de onda, modo de emissão e dose), podendo variar desde simples alterações bioquímicas celulares até a vaporização de um tecido em virtude dos elevados níveis de temperatura gerados no local. Vários são os componentes biológicos capazes de absorver a radiação Laser cujos comprimentos de onda são freqüentemente utilizados na prática clínica. Entre eles, citam-se: os ácidos nucleicos, a água e as proteínas. (DIAMANTOPOULOS, 1994).

Estudos comparando o crescimento celular de fibroblastos quando estimulados com TLBP e ultrassom pulsado de baixa intensidade (LIPUS) demonstraram que a atividade dos fibroblastos é significativamente ampliada com TLBP, demonstrando uma maior efetividade no reparo tecidual quando comparado ao LIPUS (DE OLIVEIRA *et.al.*, 2008). O crescimento de fibroblastos também foi observado por ação do laser de baixa potência em comprimentos de onda diferentes, visível e infravermelho, sendo que quando a potência de emissão dos lasers era a mesma o crescimento foi igual para os dois comprimentos de onda, mas para a mesma fluência (densidade de energia) a ação do laser infravermelho induziu uma maior proliferação (ALMEIDA-LOPES *et.al.*, 2001).

Salienta-se que a responsividade das células à radiação deve-se a absorção seletiva de seus fótons por estruturas celulares denominadas de cromóforos (fotoreceptores não especializados). Esses fotoreceptores representam, obrigatoriamente, elementos constituintes de vias bioquímicas celulares específicas, que não dependem da luz. Assim, com a absorção dos fótons presentes na radiação, as moléculas adquirem um estado eletronicamente excitado (mudança do potencial redox), causando influência na regulação cinética da respectiva via bioquímica. Esta alteração focal serve como um gatilho para uma série de alterações bioquímicas em cadeia que culminam em uma mudança das funções proliferativas de uma célula (KARU, 1987; PINHEIRO *et al.*, 2002).

Apesar de saber que os eventos bioquímicos em cadeia são os responsáveis pelos vários tratamentos de sucesso com a TLBP, os mecanismos de ação dessa modalidade terapêutica continuam não plenamente esclarecidos (KARU, 2004). Por isso, atualmente, muitos estudos estão voltados para o impacto do Laser nos processos de crescimento celular da reparação tecidual (POSTEN *et. al.*, 2005). Sabe-se que a reparação tecidual envolve uma complexa interação entre vários tipos de células, seus mediadores e citocinas, e a matriz

extracelular. Pode-se dividir esse processo em três fases, a fase inflamatória, onde as plaquetas, neutrófilos, macrófagos e linfócitos migram para a ferida, a fase proliferativa, onde há um aumento dos fibroblastos e dos macrófagos, e, finalmente, a fase de remodelamento, onde os fibroblastos ajudam a recriar a matriz extracelular e o depósito de colágeno (KIRSNER, 2003).

Os efeitos anti-inflamatórios do TLBP foram observados na ação do laser de HeNe (632,8 nm), que inibiu o aumento da sensibilidade dos nociceptores no processo inflamatório, demonstrando que o efeito analgésico pode estar relacionado com mediadores hiperalgésicos ao invés de receptores opióides periféricos (FERREIRA *et. al.*, 2005). Albertini *et. al.* (2004) demonstrou que a ação do laser do AsGaAl (650 nm) a uma fluência de 2,5 J/cm² produziu efeitos anti-inflamatórios similares aos produzidos por ação medicamentosa. Entretanto, em animais adrenalizados, a irradiação laser falhou em inibir o edema o que leva a crer que a ação anti-inflamatória do Laser ocorra por hormônios córtico esteróides.

Recentemente, Zang *et. al.* (2003), verificaram que 111 genes foram regulados pela irradiação de células com Laser de 628 nm em paralelo com o aumento da proliferação em um estudo de expressão genica de fibroblastos humanos. Esses 111 genes pertencem a 10 categorias funcionais diferentes, 7 delas estão, direta ou indiretamente, ligadas aos processos de proliferação celular e de supressão de apoptose. Por outro lado, Saygun *et. al.* (2008) demonstram que os mecanismos de bioestimulação da radiação laser (685 nm) podem estar associados com os fatores de crescimento IGF-1, bFGF e IGFBP3 produzidos por fibroblastos de gengiva humana. A ação dos fatores de crescimento tanto nas células danificadas como nas células inflamatórias é parte crítica do processo de reparação.

Os trabalhos de Hawkins e Abrahamse (2006) demonstraram que o estímulo da resposta celular (fibroblasto de ferida de pele humana) é dependente da correta densidade de energia (J/cm²) e o número de exposições, promovendo migração e proliferação pelo estímulo à atividade mitocondrial e à manutenção da viabilidade sem causar estresse ou dano adicional à célula. E que os efeitos da irradiação tem duração diferenciada, verificando que alterações na viabilidade da ATP ocorrem imediatamente após a irradiação, mas que a atividade da enzima caspase 3/7, a expressão de fatores como o bFGF e atividade da enzima ALP só são mensuráveis 24h após a irradiação (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007).

2.2 Aspectos Histológicos Epitélio da Córnea

O epitélio da córnea configura-se como do tipo pavimentoso, pluriestratificado. Pode-se dizer que o epitélio que recobre a face anterior da córnea é a continuação do epitélio da região límbica, com espessura de 50 μm . À microscopia óptica, as células basais compõem uma fileira única de células colunares que repousam sobre uma membrana basal lisa. Tal como na conjuntiva, elas são mitoticamente ativas. Acima da camada basal, encontram-se duas ou três fileiras de células poligonais e, mais superficialmente ainda, outras duas ou três fileiras de células pavimentosas não queratinizadas. (GOMES; ALVEZ, 2006).

Visto com auxílio da microscopia eletrônica, o epitélio é formado por células com citoplasma contendo redes de tonofibrilas e escassas organelas. As células basais são particularmente ricas em tonofibrilas e filamentos de actina. As tonofibrilas são responsáveis pela manutenção da arquitetura celular, enquanto que os filamentos de actina têm papel relevante na migração celular durante o processo de reparação epitelial (GOMES; ALVEZ, 2006).

As células epiteliais corneais possuem dois mecanismos principais para adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. O primeiro envolve interações moleculares entre receptores localizados na membrana celular epitelial e ligantes das células adjacentes ou da matriz extracelular. Pode-se dizer que três famílias de moléculas de adesão já foram identificadas: os N-CAM (cálcio-independentes), as caderinas (cálcio-dependentes) e as integrinas. O segundo mecanismo de adesão é representado por junções especializadas entre as próprias células epiteliais e entre as células epiteliais e o complexo membrana basal/camada de Bowman/estroma. (GOMES; ALVEZ, 2006).

O epitélio corneal possui terminações nervosas não-mielinizadas 300-400 vezes maior que a da epiderme. Pode-se dizer que estas terminações nervosas apresentam um efeito trófico no epitélio. Ainda, a estimulação das terminações nervosas simpáticas inibe a cicatrização epitelial da córnea. Paralelamente, o mesmo efeito é observado com a depleção de neurotransmissores peptidérgicos. As células epiteliais possuem receptores β -adrenérgicos, principalmente relacionados com a produção de AMPc, responsáveis pela permeabilidade das junções tipo zonas ocludentes; e receptores muscarínicos à acetilcolina, responsáveis pela

produção de GMPc, relacionados com a regulação da divisão e cicatrização celulares. (GOMES; ALVEZ, 2006).

2.2.1 Regeneração Epitelial da Córnea

No que diz respeito a regeneração epitelial da córnea, as células germinativas localizadas no limbo têm, basicamente, as seguintes propriedades:

- As células basais do limbo da córnea não expressam queratinas específicas do epitélio corneal;
- Ausência da componente estrutural das junções comunicantes intercelulares, a proteína conexina;
- Maior capacidade proliferativa *in vivo*;
- Ciclo celular lento como demonstrado em estudos com thymidina ou BRDU;
- A maioria dos tumores do epitélio corneal origina-se no limbo;
- A destruição do limbo produz estados de deficiência corneal.

Conforme demonstrações recentes, através de estudos com citometria de fluxo, estas células têm menor granulosidade citoplasmática e maior capacidade clonogênica, características de células germinativas (ROMANO *et.al.*, 2003). As diferenças da expressão de várias proteínas têm sido de grande ajuda na constante busca de um marcador para a caracterização das células germinativas do limbo corneal.

Em relação aos conhecimentos contemporâneos, é aceitável que o revestimento da superfície ocular, de forma semelhante do cutâneo adote o modelo de renovação celular mediado por células germinativas. Em se tratando da córnea, a idéia de que as células germinativas estejam na camada basal do epitélio límbico, prevalecem. Conforme relata Schofield (1983) “a hipótese do nicho de células germinativas” pressupõe que essas células estejam abrigadas em locais em que não ocorra diferenciação celular e que se encontrem protegidas de traumatismo físico e da exposição à radiação ultravioleta pelas ondulações e melanina encontradas no limbo. Romano *et.al.* (2003), também presume que a sinuosidade das elevações radiais fibrovasculares formadas pelo estroma e o epitélio do limbo, conhecidas como paliçadas de Vogt, ao se aproximarem dos vasos sanguíneos que irrigam as células

basais do epitélio, favoreçam o aporte de citocinas mantenedoras da “indiferenciação” das células germinativas.

Entre as propriedades das células germinativas, a mitose assimétrica é uma das mais importantes, pois explica como ocorrem simultaneamente diferenciação e regeneração celular. No caso do epitélio corneal, acredita-se que, após a divisão celular inicial, uma célula filha permaneça como célula germinativa para recompor o arsenal celular original, enquanto que a outra torna-se uma célula amplificadora transitória (CAT), com capacidade mitótica e de diferenciação celular. As células amplificadoras caminham para o centro da córnea, povoando sua camada basal. Após novos ciclos de divisão celular, parte delas entra em um processo de diferenciação terminal, passando pelos estágios de células pós-mitóticas (CPM), células diferenciadas terminais (CDT) e descamação. Esses estágios podem ser visualizados na Figura 1.

De forma simplificada, no processo de regeneração epitelial da córnea, células epiteliais superficiais seriam constantemente liberadas no filme lacrimal e simultaneamente substituídas por células que se movem anteriormente das camadas basais do epitélio que, por sua vez, seriam repostas por outras células basais que movimentam-se centripetamente do limbo. Esse conceito foi proposto por Thoft; Friend (1983) na hipótese do X, Y e Z e foi comprovado por uma série de observações e experimentos. X representa a proliferação e diferenciação verticalizada das células epiteliais basais (CAT→CPM→CDT); Y é a proliferação e migração centrípeta das células epiteliais límbicas (CAT); e Z representa a perda celular epitelial da superfície. Para que um estado de equilíbrio seja mantido, é necessário que $X + Y$ resulte em Z. As células epiteliais das camadas basais e suprabasais movem-se centripetamente a uma velocidade de 26 $\mu\text{m}/\text{dia}$ (NAGASAKI; ZHAO, 2003). Estima-se que o epitélio seja constantemente renovado a cada 7-10 dias.

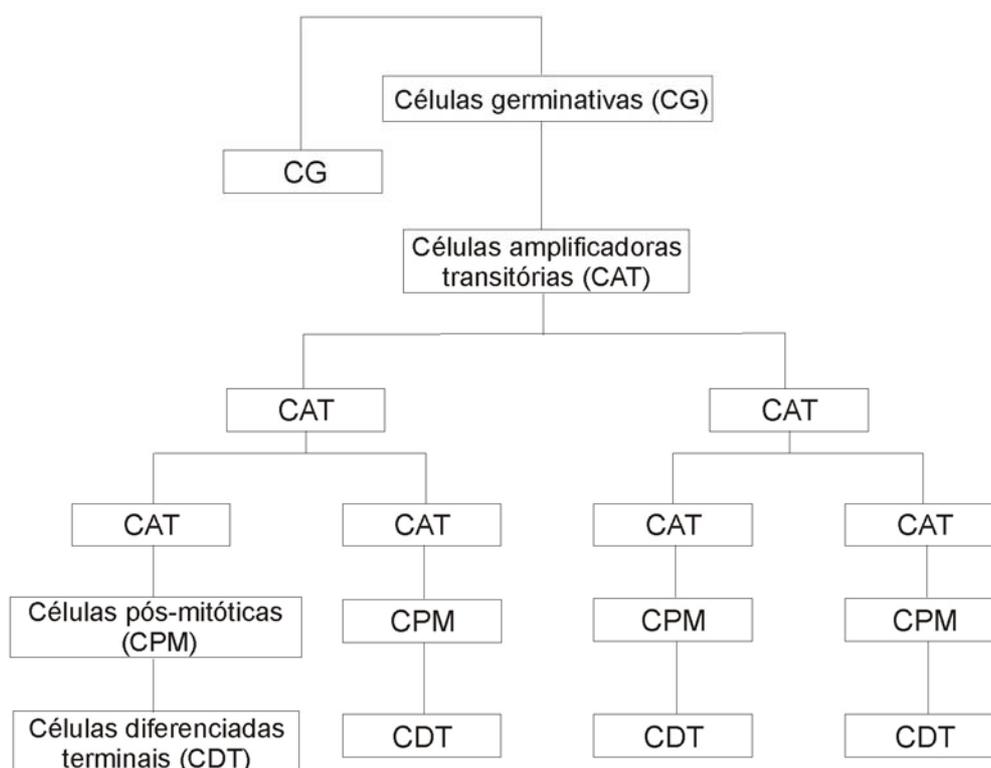


Figura 1 – Hierarquia da linhagem epitelial corneal. Esquema da proliferação das células epiteliais da córnea. CG = células germinativas; CAT = células amplificadoras transitórias; CPM = células pós-mitóticas; CDT = células diferenciadas terminais.

Fonte: Gomes ; Alves (2006, p. 17).

2.2.2 Cicatrização Epitelial da Córnea

Quando ocorre desequilíbrio na equação $X+Y=Z$, como no caso de uma abrasão corneal, inicia-se o processo de cicatrização ou reparação epitelial. Resumidamente, pode ser definido como a amplificação do processo de regeneração fisiológico que envolve eventos celulares e sub-celulares, sob a influência de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento.

O processo de regeneração pode ser dividido em três eventos principais: migração, proliferação e adesão epitelial. Estes eventos são interdependentes e ocorrem simultaneamente, porém a contribuição de cada um varia de acordo com a área, profundidade e causa da lesão (DUA *et. al.*, 1994). A Tabela 1 apresenta a relação entre os três eventos principais do processo de regeneração e os fatores de crescimento e citocinas.

Tabela 1 – Fatores de crescimento e citocinas com seus respectivos efeitos na regeneração e cicatrização epitelial da córnea.

F. de crescimento	Migração	Proliferação	Diferenciação
EGF	↑	↑	↓
bFGF	↑	↑	↑
HGF	↑	↑	↑
IGF	↑	↑	↑
KGF	↑	↑	↑
NGF	↑	↑	
PDGF	↑		
TGF- ∞	↑	↑	
TGF- β 1	↓	↓	↓
TNF	↑	↑	
IL-1 ∞	↑	↑	↑
IL-6	↑		

EGF = fator de crescimento epidérmico; bFGF = fator de crescimento fibroblástico básico; HGF = fator de crescimento do hepatócito; IGF = fator de crescimento tipo-insulina; KGF = fator de crescimento neural; PDGF = fator de crescimento derivado da plaqueta; TGF- ∞ = fator transformante- ∞ ; TGF- β 1 = fator transformante β 1; TNF = fator de necrose tumoral; IL-1 = interleucina 1; IL-6 = interleucina 6.

Fonte: Gomes ; Alves (2006, p. 18).

A seqüência que se segue à perda de uma área do epitélio da superfície ocular pode ser resumida nas seguintes etapas: logo após à lesão celular, cessa imediatamente a atividade mitótica local e a reparação se faz pela migração das células basais circunjacentes para o centro da lesão. O movimento das células, em trânsito, parece advir de um rearranjo das fibras de actina (GIPSON ; KEEZER, 1982) dentro das finas extensões filopódicas das células migrantes (PFISTER, 1994). Para transladarem-se, as células desconectam-se das vizinhas e da membrana basal e viajam, com movimentos amebóides, até seu curso ser detido pelo contato com as células de sentido oposto. Esse processo é mediado pela interação de integrinas da superfície epitelial e componentes da matriz extracelular, como fibronectina, fibrina, laminina e peptídeo de colágeno, (BERMAN *et.al.*, 1983) possuindo importante participação de substâncias proteolíticas, como ativador de plasminogênio-uro-quinase e metaloproteinases (HAYASHI *et.al.*, 1991). Em seguida, as células epiteliais voltam a se ancorar na membrana basal pelos hemidesmosomos (em torno de 18 horas após a lesão) e as mitoses retornam até o restabelecimento da espessura epitelial original. As “junções ocludentes” se refazem, restaurando a permeabilidade seletiva do epitélio (THOFT, 1989). No entanto, a complementação da adesão epitelial pelas fibrilas ancorantes ao estroma da córnea e o término do processo de reestruturação integral epitelial só é finalizado meses após o início da cicatrização (ESPANA *et.al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar a ação do laser de baixa potência de AsGaAl com 650 nm de comprimento de onda e dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$ sobre o processo de reparo tecidual do epitélio da córnea de coelhos.

Como objetivos específicos buscou-se verificar se o laser de AsGaAl (650nm) em doses diárias de $1,5 \text{ J/cm}^2$ apresentou alguma diferença estatisticamente mensurável na velocidade de reparo tecidual e na qualidade do epitélio neoformado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento Animal

Nesse trabalho foram realizados dois experimentos com animais, o experimento piloto e o experimento final. Nos dois casos foram utilizados coelhos Nova Zelândia, com idade em torno de 25 dias, peso de 800g a 1 kg, machos, sendo divididos em 02 grupos, um grupo controle e outro irradiado. Para o experimento piloto foram utilizados um total de 6 animais, 3 no grupo controle e 3 no grupo irradiado. Para o experimento final foram utilizados um total de 16 animais, 8 para o grupo controle e 8 para o grupo irradiado. Os protocolos de desepitelização da córnea e de irradiação foram iguais nos dois experimentos e são descritos a seguir. Os grupos controles também tiveram suas córneas desepitelizadas, mas não passaram pelo processo de irradiação laser. Tanto para o grupo controle como para o grupo irradiado os dois olhos de cada animal foram desepitelizados com ação anestésica descrita no item 4.1.1. Ao final do período de tratamento, conforme apresentado na Tabela 2, os animais foram anestesiados com Butorfanol 0,5mg/kg, 40mg/kg de Ketamina (Syntec) e 8mg/kg de Xilazina (Syntec) e, após aprofundamento da anestesia, foram eutanasiados com 5ml de Cloreto de Potássio a 19,1% via intracardíaca. Logo após a eutanásia, foi feita a enucleação dos dois olhos com técnica de assepsia padrão, como pode ser observado na Figura 2. Os olhos foram conservados em solução de formol tamponado a 10% para posterior análise histológica. Os processos de desepitelização da córnea, irradiação com laser de baixa potência e análise histológica são descritos a seguir.



Figura 2 – Enucleação dos olhos dos animais

4.1.1 Deseptelização da córnea

Para realizar o processo de deseptelização da córnea os animais foram anestesiados com Butorfanol 0,5mg/kg, em seguida foram aplicados 40mg/kg (0,4ml/kg) de Ketamina (Syntec) e 8mg/kg (0,4ml/kg) de Xilazina (Syntec). Como anestésico local foi utilizado o Anestalcon[®] (Cloridrato de proximetaína 0,5%), 1 gota por olho, e para miose 2 gotas por olho de Pilocarpina[®] (Cloridrato de pilocarpina 4%), os dois antes da deseptelização. Com os animais sedados a deseptelização foi realizada utilizando um marcador de zona óptica de diâmetro igual a 6,5 mm e um micromotor. O olho marcado para retirada do epitélio pode ser visto na Figura 3. Para ação antiinflamatória e antibiótica foram aplicados 3 vezes ao dia até o abate os colírios Cetrolac[®] (cetorolaco de trometamina 5mg/ml) antiinflamatório não hormonal e o Vigamox (moxifloxacino 0,5% - cloridrato) respectivamente.

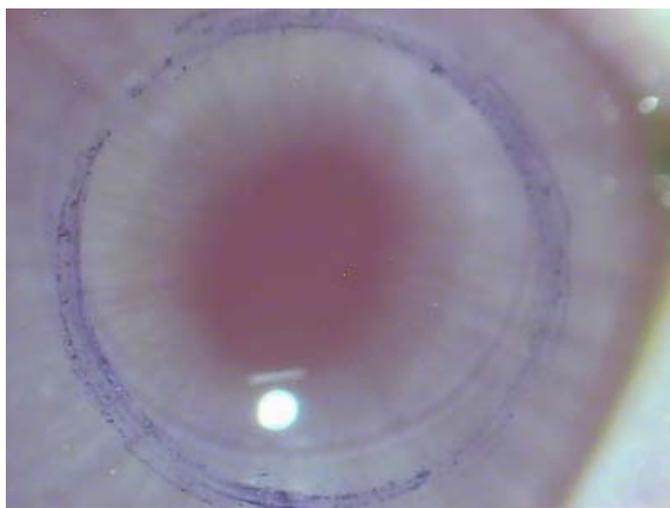


Figura 3 – Olho de coelho marcado para retirada do epitélio

A deseptelização consiste em um processo de raspagem muito delicado e, para visualização do processo, foi utilizado um estereoscópio (Edmund Scientific Co.). As córneas *in vivo* foram fotografadas logo após a deseptelização (0h), 24 horas, 48 horas, 72h e 96h com uma câmara de vídeo digital (JVC – TKC1480E) acoplada a um microcomputador. A fim de marcar a área deseptelizada foi utilizado um marcador fluorescente, a fluoresceína, 1 gota por olho. A Figura 4 apresenta o processo de coleta das imagens fotográficas dos olhos utilizando o estereoscópio.



Figura 4 – Coleta das imagens no estereoscópio

As imagens foram registradas e analisadas (determinação numérica de diâmetro desepitelizado) com o software Leica Q-Win. Os períodos de tratamento e recuperação após a desepitelização até o sacrifício dos animais foram de 48 horas (4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo irradiado no experimento final), 72 horas (4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo irradiado no experimento final) e 96 horas (3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo irradiado no experimento piloto). A tabela 2 apresenta os períodos de tratamento para cada animal em cada grupo.

Tabela 2 – Período de tratamento dos animais por grupo e por experimento

Experimento	Grupo	Animal	Período de tratamento e recuperação
Final	Controle	1	72 horas
		2	
		3	
		4	
	Irradiado	5	48 horas
		6	
		7	
		8	
Piloto	Controle	1	72 horas
		2	
		3	
		4	
	Irradiado	5	48 horas
		6	
		7	
		8	
	Controle	1	96 horas
		2	
		3	
	Irradiado	1	
		2	
		3	

4.1.2 Irradiação

Para irradiação foi utilizado um laser de diodo AsGaAl (Microdont[®]), em 650 nm, potência de 40 mW, tempo de irradiação de 60 s, diâmetro de irradiação de 1,4 cm e fluência de 1,5 J/cm². O equipamento da Microdont[®] possui uma lente acoplada à saída que permite que o foco do feixe laser seja ampliado, desta forma foi possível obter o diâmetro de 1,4 cm a uma distância aproximada de 15 cm da saída do feixe. A dose de 1,5 J/cm² foi medida nessa configuração, com a ajuda do medidor óptico multifuncional da Newport modelo 1835-C. O laser utilizado apresenta modo de emissão contínuo. Foram realizadas irradiações em 0 h,

24h, 48h, 72h e 96h. Ambos os olhos foram irradiados de maneira a evitar a interferência do efeito sistêmico produzido pela biomodulação deste tipo de radiação. Antes de iniciar a irradiação, foi instilado 1 gota de pilocarpina (50 μ l) (colírio que causa miose) em cada olho para diminuir o ofuscamento gerado pelo laser. A Figura 5 apresenta o processo de irradiação.



Figura 5 – Processo de irradiação com laser de baixa potência

4.1.3 Histologia

Todo o processo de preparo das lâminas histológicas foi realizado no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Campus de São José dos Campos (Unesp), com a supervisão do prof. Dr. Miguel Angelo C. Salgado.

Para viabilizar o preparo das lâminas histológicas das córneas foi necessário infiltrar dentro do globo ocular cerca de 1 ml de solução de formol tamponado a 10% e conservar os

globos em solução de formol tamponado a 10%. Após esse procedimento foi possível cortar os globos sem que as paredes colabassem.

Os testes de fixação e posterior preparo da lâmina revelaram dobras nos tecidos alvo em função da parede do globo ocular e córnea estarem juntas, várias espessuras para corte e preparo da lâmina foram testadas, mas pela permanência do problema, optou-se por incluir a córnea separadamente do restante do globo ocular. As córneas foram cortadas ao meio e as duas metades fixadas no mesmo bloco. Foram preparadas 5 lâminas semi seriadas de cada córnea.

A obtenção das fotomicrografias foi realizada com o auxílio do microscópio Leica modelo DM LB2 com captura das imagens por meio da câmera Leica modelo DFC280 e do programa Leica IM50 versão 4.0. A Figura 6 apresenta uma fotomicrografia de lâmina de córnea, onde é possível visualizar o epitélio normal da córnea em dois aumentos.

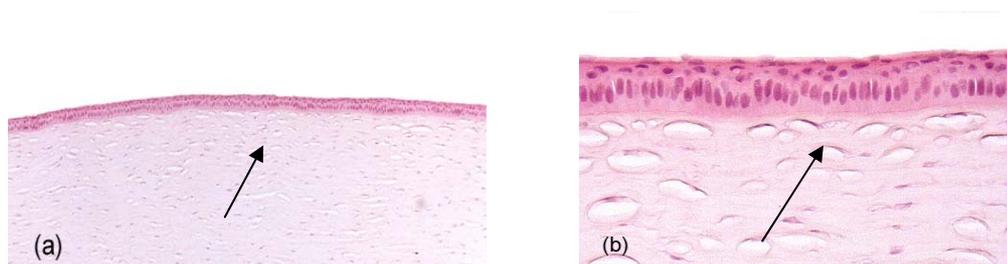


Figura 6 – Fotomicrografia de córnea de coelho em lâmina teste com destaque para epitélio normal. H.E. Aumento de 5x em (a) e aumento de 20x em (b).

Após acertado os processos de preparo das lâminas histológicas, os testes com coloração HE (Hematoxilina-Eosina) e com Tricrômico de Mallory mostraram que a coloração Mallory diferencia melhor o epitélio neoformado conforme pode ser visto na Figura 7.

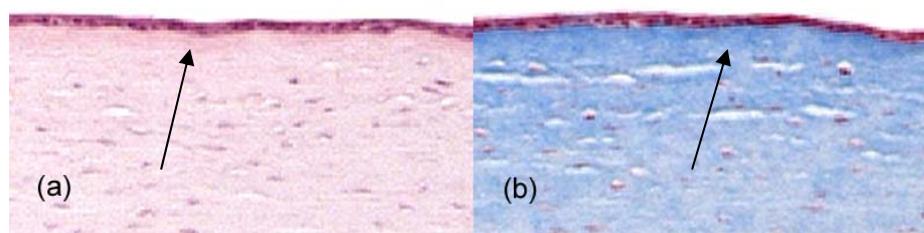


Figura 7– Fotomicrografia da córnea de coelho com epitélio neoformado corada com (a) HE e (b) Tricrômico de Mallory.

As medidas histomorfométricas do crescimento do epitélio corneano foram obtidas com o auxílio do programa Adobe® Photoshop® 7.0. A partir da aplicação de grades de dimensão conhecida sobre as fotomicrografias de aumento de 5x foi possível mensurar a extensão não epitelizada das córneas tratadas e não tratadas com laser de baixa potência.

5 RESULTADOS

A análise clínica morfológica *in vivo* foi realizada por meio das fotografias das córneas marcadas com fluoresceína, obtidas com o estereoscópio, Figura 8.



Figura 8 – Imagens fotográficas da região desepitelizada marcada com fluoresceína para os tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h.

Utilizando o software Leica Q-Win foi possível medir o diâmetro das córneas que estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 03 - Medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise clínica morfológica *in vivo*.

		Medidas do diâmetro da córnea (μm)									
Córneas		Controle					Irradiado				
		0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h
experimento final	1	5720,00	3965,00	910,00	0,00		5720,00	4336,80	1510,60	473,20	
	2	5361,20	4089,80	1905,80	1547,00		5356,00	4212,00	1079,00	0,00	
	3	5928,00	4412,20	1206,40	0,00		5720,00	4290,00	1404,00	728,00	
	4	5473,00	4004,00	1560,00	1456,00		5491,20	4290,00	1573,00	616,20	
	5	5356,00	3814,20	738,40	0,00		5421,00	3770,00	1976,00	1430,00	
	6	5582,20	4165,00	1508,00	624,00		5314,40	4006,60	2860,00	2080,00	
	7	5699,20	4139,20	1456,00	0,00		5649,80	3614,00	1723,80	954,20	
	8	5408,00	3900,00	2210,00	988,00		5772,00	3884,40	1612,00	1118,00	
	9	5928,00	3770,00	2529,80			5590,00	3725,80	2498,60		
	10	5530,20	3380,00	2392,00			6058,00	3523,00	2600,00		
	11	5215,60	3796,00	2210,00			5668,00	3406,00	2340,00		
	12	5798,00	3606,20	2211,30			5590,00	2860,00	1690,00		
	13	5590,00	4560,40	2548,00			5265,00	3341,00	2470,00		
	14	5330,00	3120,00	1937,00			5779,80	3120,00	2730,00		
	15	5421,00	4290,00	3135,60			5504,20	4014,10	2888,60		
	16	5574,40	4030,00	3120,00			5811,00	3658,20	3226,60		
experimento piloto	17	5999,00	4221,00	2332,20	0,00	0,00	5948,00	3924,00	1054,80	0,00	0,00
	18	5998,00	4256,00	2299,00	0,00	0,00	5505,00	3450,00	505,00	0,00	0,00
	19	5999,90	4255,00	2292,00	0,00	0,00	5862,00	3749,00	714,00	0,00	0,00
	20	5995,80	4330,00	2227,00	0,00	0,00	5406,00	3419,00	495,00	0,00	0,00
	21	5205,50	3486,00	1850,00	0,00	0,00	5998,00	4149,30	1325,00	0,00	0,00
	22	5482,00	3552,00	1845,00	0,00	0,00	5951,30	4087,00	1085,00	0,00	0,00
	Média	5617,95	3961,00	2019,25	329,64	0,00	5653,67	3765,01	1789,14	528,54	0,00
	DP	267,57	364,99	614,91	578,95	0,00	230,27	399,20	811,30	665,31	0,00

Os resultados apresentados na Tabela 3 foram obtidos para o experimento piloto e para o experimento final divididos nos diversos tempos de análise, 0h, 24h, 48h, 72h e 96h, sendo que para esse último tempo foram analisadas 6 córneas do grupo controle e 6 córneas do grupo irradiado, todas no experimento piloto. Para os tempos de 0h, 24h e 48h foram analisadas 22 córneas do grupo controle e 22 córneas do grupo irradiado. Para o tempo de 72 horas foram analisadas 14 córneas do grupo controle e 14 córneas do grupo irradiado. Os valores de média e desvio padrão também são apresentados para os conjuntos de dados nos diferentes tempos.

A análise de significância estatística foi realizada nos diferentes conjuntos de dados para os tempos 0h, 24h, 48h e 72h, entre as medidas do diâmetro das córneas dos grupos controle e irradiado, com o programa Origin[®] 6.0 aplicando o teste “one-way ANOVA”. Para o tempo 96h o teste não foi aplicado, pois a média e desvio padrão são nulos. Os resultados dessa análise estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Significância estatística das medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise clínica morfológica *in vivo*.

Teste de significância – ANOVA			
Comparação entre controle e irradiado			
0h	24h	48h	72h
p = 0,63759	p = 0,09662	p = 0,29509	p = 0,40646

A partir da análise do diâmetro re-epitelizado, dos animais do experimento piloto, foi possível observar uma re-epitelização mais acentuada para o grupo irradiado até 48h, como verificado na Figura 9. Por essa razão, definiram-se novos períodos de tratamento para os 16 animais do experimento final, de 48h e 72h, conforme já apresentado na Tabela 2, a fim de verificar histologicamente essa ação.

Por outro lado, a plotagem dos dados da Tabela 3, reunindo os dados do experimento piloto e do experimento final, é apresentada na Figura 10.

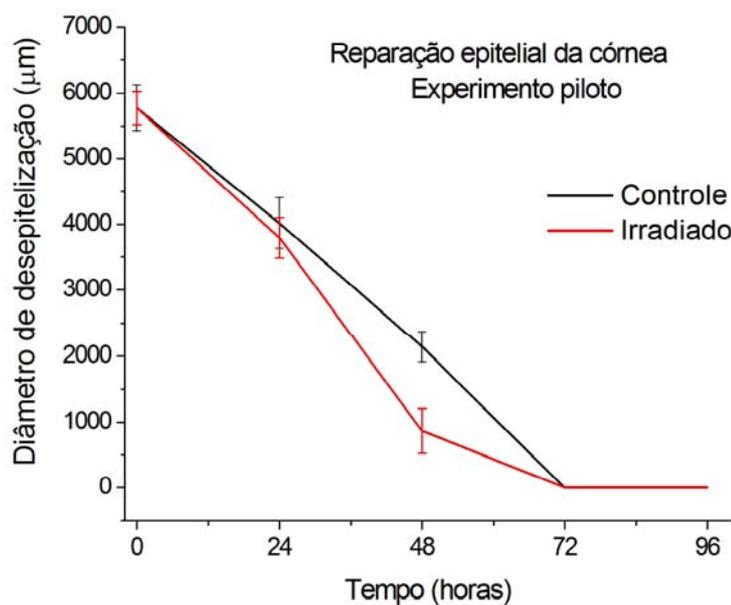


Figura 9 – Reparação epitelial da córnea no experimento piloto

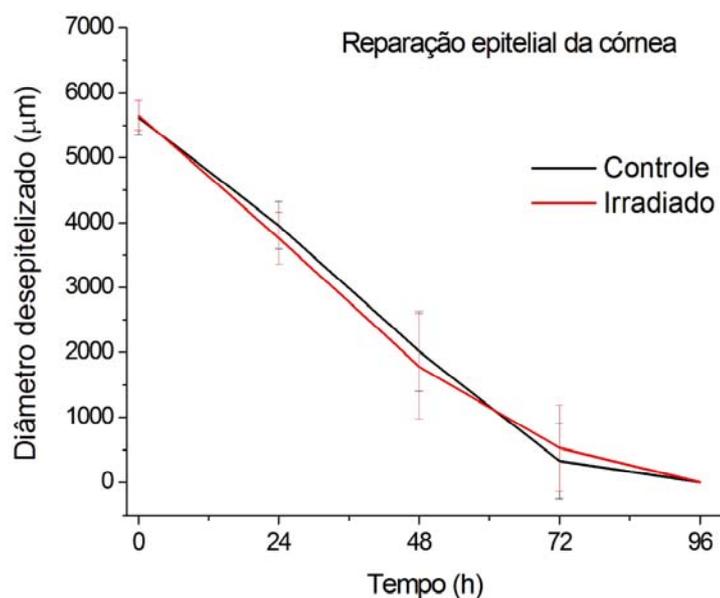


Figura 10 – reparação epitelial da córnea

A análise morfológica das córneas em processo de re-epitelização é apresentada para os grupos controle e irradiado para o tempo de 48h nas figuras 11 e 12 respectivamente. As fotomicrografias das cornas dos animais do grupo controle (Figura 11) apresentam em (a) o epitélio normal, em (b) a regeneração do epitélio e em (c) região central da córnea que ainda não foi recoberta por novo epitélio.

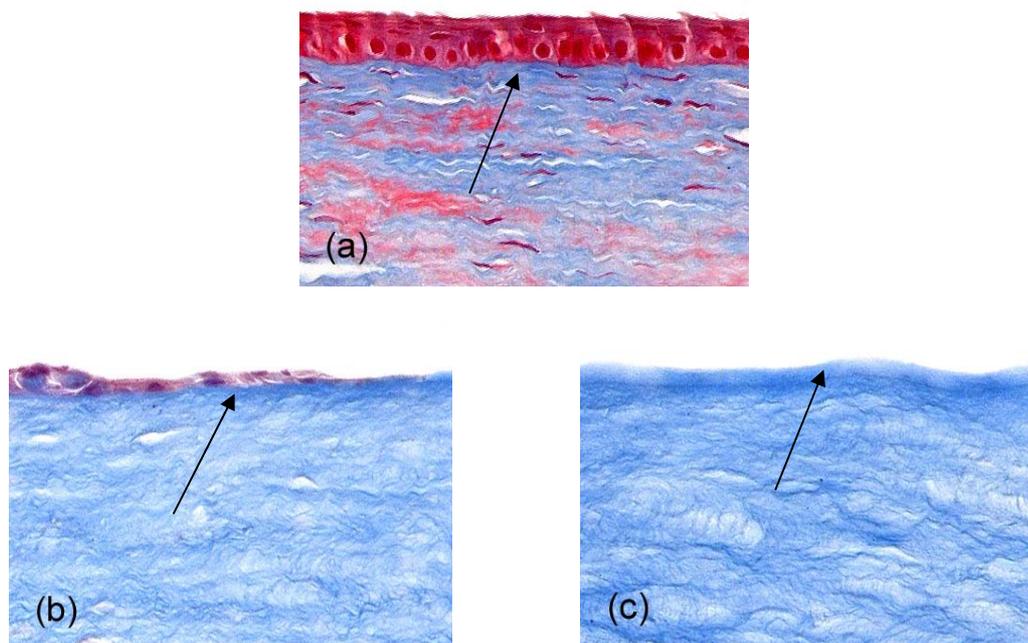


Figura 11 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Controle, período de 48 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) e (c) regeneração do epitélio na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x.

As fotomicrografias das cornas dos animais do grupo irradiado (Figura 12) apresentam em (a) o epitélio normal, em (b) a regeneração do epitélio e em (c) região central da córnea que ainda não foi recoberta por novo epitélio.

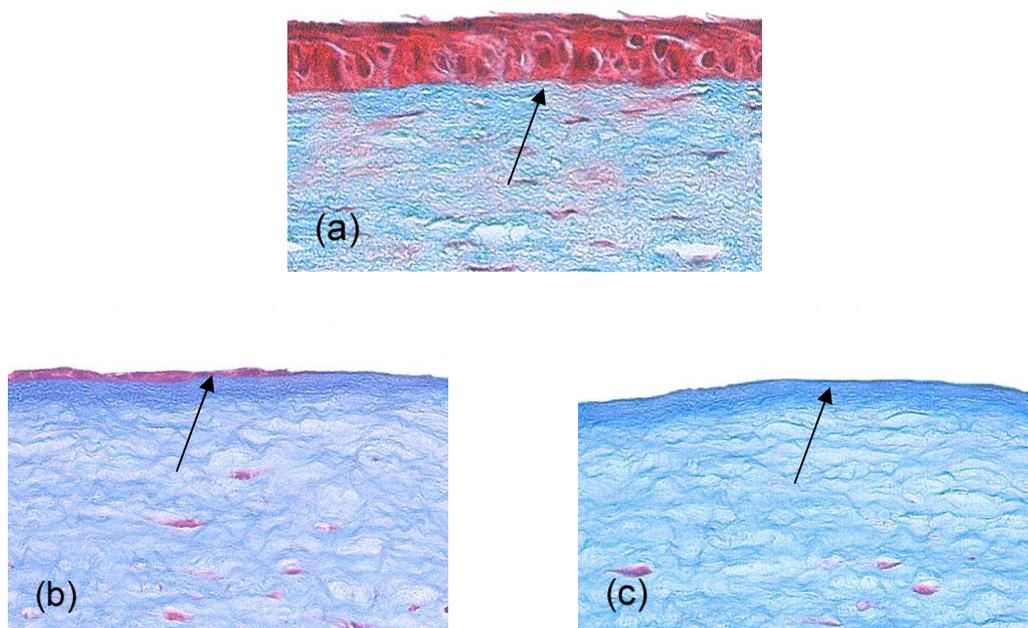


Figura 12 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Irradiado, período de 48 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) e (c) regeneração do epitélio na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x.

As Figuras 13 e 14 apresentam o processo de re-epitelização para os grupos Controle e Irrradiado para o tempo de 72h. As fotomicrografias das córneas dos animais do grupo controle (Figura 13) apresentam em (a) o epitélio normal e em (b) presença do epitélio neoformado na região central da córnea.

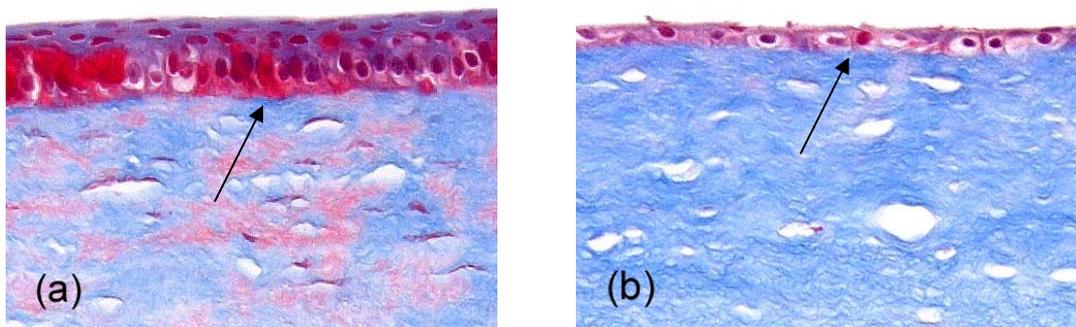


Figura 13 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Controle, período de 72 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) presença do epitélio neoformado na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x.

As fotomicrografias das córneas dos animais do grupo irradiado (Figura 14) apresentam em (a) o epitélio normal e em (b) presença do epitélio neoformado na região central da córnea.

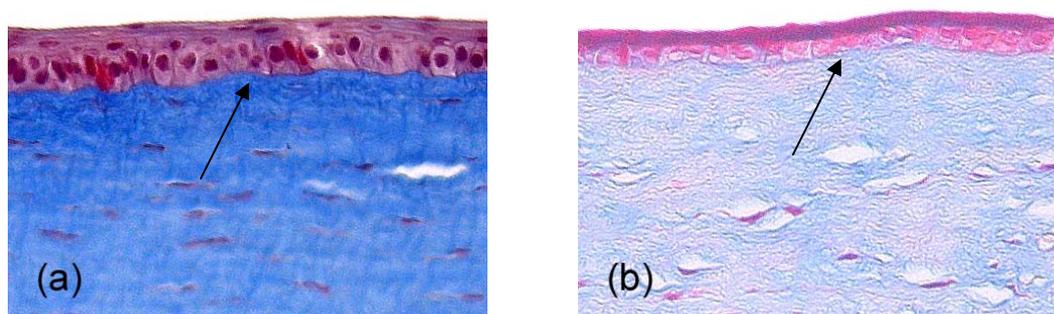


Figura 14 - Fotomicrografia da córnea de coelhos do grupo Irrradiado, período de 72 horas. (a) epitélio normal da região periférica; (b) presença do epitélio neoformado na região central da lesão. Tricrômico de Mallory. 20x.

Os resultados da análise histomorfométrica dos grupos controle e irradiado em 48h e 72h estão reunidos na Tabela 5. Verifica-se que a análise histomorfométrica do grupo controle só foi realizada sobre as córneas esquerdas. Entretanto, para o grupo irradiado todas as córneas foram analisadas.

Tabela 5 – Medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise histomorfométrica.

Medidas do diâmetro da córnea - histomorfometria (μm)					
	Córneas	Controle		Irradiado	
		48h	72h	48h	72h
experimento final	1				0,00
	2		0,00		0,00
	3				0,00
	4		0,00		0,00
	5				1069,70
	6		0,00		3149,70
	7				0,00
	8		0,00		0,00
	9	0,00		594,30	
	10			1723,40	
	11	2674,30		59,40	
	12			772,60	
	13	118,90		2080,00	
	14			1842,30	
	15	1188,60		2080,00	
	16			2377,10	
Média		995,45	0,00	1441,14	527,43
DP		1240,31	0,00	845,68	1123,73

A análise de significância estatística foi realizada nos diferentes conjuntos de dados para os tempos 48h e 72h, entre as medidas do diâmetro das córneas dos grupos controle e irradiado, com o programa Origin[®] 6.0 aplicando o teste “one-way ANOVA”.

Tabela 6 - Significância estatística das medidas de diâmetro desepitelizado de córnea obtidas na análise histomorfométrica.

Teste de significância – ANOVA	
Comparação entre controle e irradiado	
48h	72h
p = 0,47516	p = 0,38119

O histograma representativo dos dados histomorfométricos é apresentado na Figura 15.

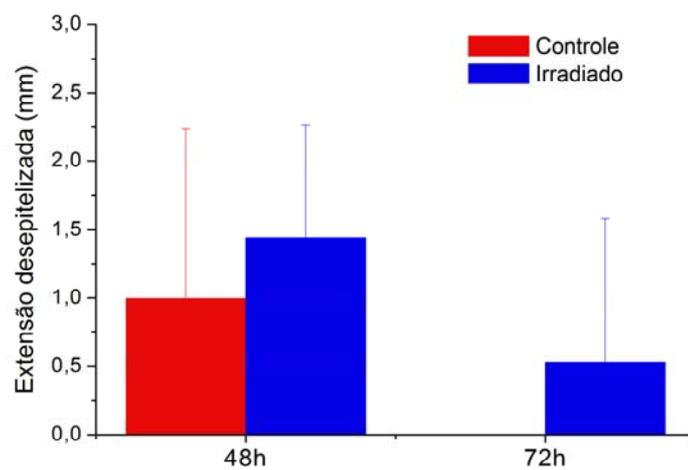


Figura 15 – Histomorfometria dos grupos controle e irradiado em 48h e 72h

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscou-se verificar os efeitos da TLBP como a aceleração do processo cicatricial e a melhor organização do epitélio neoformado sobre o processo de cicatrização corneana, uma vez que esses dois efeitos aliados poderiam contribuir para o restabelecimento das características funcionais da córnea como a transparência e as propriedades refrativas. Entretanto, os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 6 demonstram que não há diferença significativa na velocidade de cicatrização das córneas tratadas com Laser de baixa potência e o grupo controle. Acredita-se que a ausência de vascularização no Endotélio, onde repousam as células basais do epitélio, e a característica das células endoteliais presentes no tecido conjuntivo, achatadas, com pouco citoplasma e poucos fatores de crescimento, tenham inviabilizado o processo de fotobioestimulação com TLBP.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que os tempos de tratamento, 48h e 72h, até o fechamento do epitélio corneano, foram adequados para o objetivo do trabalho que era a verificação da ação da TLBP sobre o processo de re-epitelização corneana, pois em 96h o epitélio se apresentou completamente fechado, tanto para o grupo controle como para o grupo irradiado.

A análise histomorfométrica do diâmetro da córnea desepitelizada, disponível na tabela 5, demonstra que todas as córneas analisadas do grupo controle apresentaram fechamento do epitélio e que, para o grupo irradiado, duas das 8 córneas não apresentaram fechamento do epitélio. Observa-se que essas duas córneas pertenciam ao mesmo animal, o que pode ser indicativo de que o não fechamento seja um efeito sistêmico do animal em questão.

Por outro lado, os resultados apresentados na Tabela 5 parecem estar em desacordo com os resultados apresentados na Tabela 3, no que diz respeito a medida do diâmetro desepitelizado em 72 horas tanto para o grupo controle como para o grupo irradiado. Observa-se que as medidas histomorfométricas revelam um epitélio completamente fechado em 72 h para as córneas esquerdas do grupo controle, e essas mesmas córneas não apresentam fechamento na análise clínica morfológica *in vivo*. Para o grupo irradiado o mesmo acontece, na análise clínico morfológica apenas uma das 8 córneas analisadas apresenta fechamento total de epitélio, enquanto que na análise histomorfométrica 6 das 8 córneas estão fechadas.

Essa aparente discrepância entre os resultados ocorre pela característica própria da análise clínico morfológica *in vivo*, pois utiliza a fluoresceína como marcador a fim de permitir identificação da região desepitelizada. Como há apenas uma fina camada de epitélio neoformado, a fluoresceína pode estar se aderindo à córnea e criando a falsa idéia de epitélio não formado, pois essa fina camada ainda não apresenta impermeabilidade.

A dose utilizado em nosso trabalho foi de $1,5 \text{ J/cm}^2$, uma dose inferior às verificadas na literatura para biomodulação de tecidos. Todavia, a escolha se deu em função da ausência de literatura relatando a utilização do Laser de AsGaAl para fotobioestimular o crescimento de epitélio corneano. Entretanto, o AsGaAl aparece como agente biomodulador em vários trabalhos.

Pugliese *et.al.* (2003) observaram que o Laser de AsGaAl (670 nm) induziu a biomodulação de colágeno e fibras elásticas com densidades de energia de 4 e 8 J/cm^2 , evidenciando um aumento no depósito desses elementos fibrilares em animais submetidos a terapia com Laser. Da mesma forma, Rocha Jr. *et.al.* (2006), aplicando Laser de AsGaAl (870 nm) com densidade de energia de $3,8 \text{ J/cm}^2$ em feridas cutâneas de ratos observou que a TLBP acelerou a proliferação tecidual, aumentou a vascularização local, apresentou um significativo aumento na proliferação fibroblástica e formou um tecido de granulação mais organizado.

Além de verificar o aumento na produção do fator de crescimento bFGF com a TLBP, o estudo de Hourel e Abrahamse (2008) mostrou que células de feridas de animais diabéticos (WS1) respondem em função de dose e de comprimento de onda. Para diferentes comprimentos de onda (632,8 or 830 nm), com fluência de 5 J/cm^2 , o efeito foi estimulatório, as feridas estavam completamente fechadas em 4 dias e as células estavam protegidas da apoptose, enquanto que células irradiadas com 16 J/cm^2 mostraram fechamento de ferida incompleto e aumento da apoptose.

A cicatrização de feridas é uma interação complexa entre muitos tipos de células e suas citocinas e mediadores, e a matriz extracelular (POSTEN *et.al.*, 2005). Em feridas cutâneas a cicatrização também é um processo dinâmico, que se inicia assim que a injúria acontece, e durante o qual ocorre a proliferação celular e síntese de elementos que constituem

a matriz extracelular como o colágeno, a elastina e as fibras reticulares (THOMAS *et.al.*, 1995; ROCHKIND *et.al.*, 1989; KIRSNER, 2003).

Saygun *et.al.* (2008) observou em cultura de células de fibroblastos de gengiva humana que o efeito bioestimulatório da TLBP pode estar associado com o aumento da produção de fatores de crescimento como IGF-1, bFGF e IGFBP3. Safavi *et.al.* (2008) tratando animais com HeNe (632,8 nm) com dose de 7,5 J/cm² observou que os efeitos inibitório da TLBP sobre a produção da Interleucina IL-1 β e do interferon IFN- γ e estimulatório sobre os fatores de crescimento TGF- β e PDGF podem ser responsáveis pela ação anti-inflamatória e os resultados positivos nos processos de reparo tecidual. A inibição da expressão gênica da citocina pro-inflamatória IL-1 β também foi observada no trabalho de Gavish *et.al.* (2006). Nesse estudo, os pesquisadores também demonstraram que a TLBP estimulou a proliferação de células de músculo liso de artéria aórtica de porcos, aumentou a síntese de colágeno e modulou a atividade e expressão das metaloproteinases MMP-2, MMP-1 e TIMP-2.

Da mesma forma, a cicatrização corneana nada mais é do que uma resposta de defesa celular observada nos quadros de infecção e injúria mecânica, cujos principais objetivos são a restauração da estrutura tecidual e o restabelecimento de suas características funcionais como a transparência e as propriedades refrativas da córnea (BALDWIN; MARSHALL, 2002; NETTO *et.al.*, 2005). O processo cicatricial de reparação do trauma se inicia imediatamente após a lesão epitelial, com a secundária liberação de citocinas e fatores de crescimento (WILSON *et.al.*, 1996; MOHAN *et.al.*, 1997; HELENA *et.al.*, 1998; NETTO *et.al.* 2005b).

No processo de cicatrização da córnea a interleucina IL-1 juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF- α), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a proteína morfogenética óssea 2 e 4 (BMP) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) têm um papel especial modulando muitos processos chaves envolvidos na cicatrização do estroma, como a síntese dos Fas ligantes que participam do processo de indução da apoptose (NETTO *et.al.*, 2005b; DRUPPS; WILSON, 2006). Além disso, o IL-1 regula a produção dos fatores de crescimento HGF, KGF, PDGF e outras citocinas (NETTO *et.al.*, 2005b).

Da mesma forma, a ação do fator de crescimento TGF- β é dependente de sua concentração, podendo em alguns momentos contribuir para o fechamento do epitélio corneano e em outros inibir esse processo, como foi verificado em um extenso levantamento sobre os fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização do epitélio da córnea realizado por Baldwin and Marshall (2002). Dessa forma, pode-se considerar que a fluência de irradiação com Laser de baixa potência poderá ter influência direta na concentração do TGF- β e, conseqüentemente, no processo de cicatrização do epitélio da córnea.

Outro aspecto relevante, no processo de modulação dos efeitos dos fatores de crescimento sobre os mecanismos de reparação epitelial da córnea, reside no desafio de promover a reparação tecidual pela via da regeneração preferencialmente à reação cicatricial tipo fibrótica, que devido a alta concentração de miofibroblastos resulta na opacificação corneana (NETTO et.al., 2005; 2005b). Acredita-se que a escolha entre a regeneração ou a fibrose reside no controle da ativação fibroblástica (NETTO, et.al., 2005b). Logo, como apresentado anteriormente, a ação da TLBP, que apresenta significativo aumento na proliferação fibroblástica em outros tecidos, pode não ser o estímulo ideal para o processo de reparo tecidual do epitélio da córnea

Entretanto, é importante salientar, pela revisão bibliográfica, que a ação das diversas citocinas e dos fatores de crescimento envolvidos na reparação epitelial corneana ainda não está completamente elucidada. Da mesma forma, a ativação dessas citocinas e fatores de crescimento pela ação do Laser de baixa potência também não é completamente conhecida ou plenamente relacionada às dosagens ou aos comprimentos de onda de irradiação. Portanto, não é possível excluir a TLBP como um possível processo auxiliar no reparo tecidual do epitélio da córnea.

Então, necessário se faz melhor compreender os mecanismos de ação do processo de reparo tecidual com a ação do Laser e, especificamente, os mecanismos de reparo do epitélio da córnea. Portanto, estudos complementares, envolvendo diferentes dosagens, comprimentos de onda, processos de análise que permitam verificar o comportamento dos principais fatores de crescimentos e citocinas envolvidos no reparo corneano, deverão ser realizados antes de se formular uma conclusão definitiva sobre a ação da TLBP no processo de reepitelização corneana.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos resultados apresentados e discutidos no presente trabalho, que a ação do Laser de baixa potência AsGaAl de 650 nm e fluência de $1,5 \text{ J/cm}^2$ não apresentou diferença significativa na aceleração do processo de reparo tecidual do epitélio da córnea, nem na qualidade do epitélio neoformado.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F. S.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S. A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ZÂNGARO, R. A.; LOPES-MARTINS, R. A. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J. photochem. photobiol. B.**, v. 74, n. 2-3, p. 101-107, 2004.
- ALMEIDA LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI NETO, J.; JAEGER, M. M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Sur. Med.**, v.29, p.179-184, 2001.
- AMARAL, André Capado. **Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo).** Universidade Federal de São Carlos. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- BALDWIN, H. C.; MARSHALL, J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: a review. **Acta Ophthalmol. Scand.**, v.80, p.238-247, 2002.
- BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tools. **Laser Surg. Med.**, v.16, p.331-342, 1995.
- BERMAN M, MANSEAU E, LAW M, AIKEN D. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 24, n. 10, p. 1358-1366, 1983.
- CREDIE, M. G.; NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; FELBERG, S.; AMORIM, F.; DANTAS, P. E. C. Alterações quantitativas do filme lacrimal após cirurgia refrativa: estudo comparativo entre PRK e LASIK. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.70, n.1, p.23-30, 2007.
- DE OLIVEIRA, R. F.; OLIVEIRA, D. A.; MONTEIRO, W.; ZANGARO, R. A.; MAGINI, M.; SOARES, C. P. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, n 1, p. 6-9, 2008.
- DIAMANTOPOULOS, C. Bioenergetic and tissue optics. In: BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: Theory and Practice.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
- DRUPPS JR., W.; WILSON, S.E. Biomechanics and wound healing in the cornea. **Exp. Eye Res.**, v.83, p.709-720, 2006.
- DUA, H.S.; GOMES, J.A.P.; SINGH, A. Corneal epithelial wound healing. **Br J Ophthalmol.**, v. 78, p. 401-408, 1994.
- ESPANA, E.M.; GRUETERICH, M.; MATEO, A.; ROMANO, A.C.; YEE, S.B., YEE, R.W.; TSENG, S.C.G. Cleavage of corneal basement membrane components by ethanol

exposure in laser-assisted subepithelial keratectomy. **Journal of Cataract; Refractive Surgery.**, v. 29, n. 6, p. 1192-1197, 2003.

FERREIRA, D.M.; ZÂNGARO, R.A.; VILLAVARDE, A.B.; CURY, Y.; FRIGO, L.; PICOLO, G.; LONGO, I.; BARBOSA, D.G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed Laser Surg.**, v.23, n. 2, p. 177-181, 2005.

GAVISH, L.; PEREZ, L.; GERTZ, S.D. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. **Lasers Surg. Med.**, v.38, p.779-786, 2006.

GIPSON IK, KEEZER L. Effects of cytochalasins and colchicine on the ultrastructure. of migrating corneal epithelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 22, n. 5, p. 643-650, 1982.

GOMES, J.Á.P.; ALVES, M.R. **Superfície ocular: córnea, limbo, conjuntiva, filme lacrimal.** Rio de Janeiro, 2006.

HAYASHI, K.; BERMAN, M.; SMITH, D.; EL-GHATIT, A.; PEASE, S.; KENYON, K.R. Pathogenesis of corneal epithelial defects: role of plasminogen activator. **Curr Eye Res.**, v. 10, n.5, p.381-398, 1991.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.**, v. 24, n. 6, p. 705-714, 2006.

HAWKINS D.; ABRAHAMSE H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. **Photomed Laser Surg.**, v. 88, n. 2-3, p. 147-155, 2007.

HELENA MC, BAERVELDT F, KIM WJ, WILSON SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.39, n.2, p.276-283, 1998.

HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci.**, v.23, p.11-18, 2008.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J. Quantum Electron.**, v.23, p.1703-1717, 1987.

KARU, T. High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy. **Laser in Surgery and Medicine.**, v. 34, p. 298-299, 2004.

KIRSNER, R. Wound healing. In BOLOGNIA J., JORIZZO J., RAPINI R., editors. **Dermatology.** Bologna: Mosby, 2003. p.2207-2218.

MESTER, E.; JUHASZ, J.; VARGA, P.; KARIGA, G. Lasers in clinical practice. **Acta Chir Acad Sci Hung.**, v. 9, n. 3, p. 349-357, 1968.

MOHAN RR, LIANG Q, KIM WJ, HELENA MC, BAERVELDT F, WILSON SE. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. **Exp Eye Res.**, v.65, n.4, p.575-589, 1997.

NAGASAKI, T.; ZHAO, J. Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, p. 558-566, 2003.

NETTO, M.V.; AMBRÓSIO JR., R.; CHALITA, M.R.; KRUEGER, R.R.; WILSON, S.E. Resposta cicatricial corneana em diferentes modalidades de cirurgia refrativa. **Arq. Brás. Oftalmol.**, v.68, n.1, p.140-149, 2005.

NETTO, M.V.; MOHAN, R.R.; AMBRÓSIO JR., R.; HUTCHEON, A.E.K.; ZIESKE, J.D.; WILSON, S.E. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. **Cornea**, v.24, n.5, p.509-522, 2005b.

PFISTER RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. **CLAO J.**, v.20, n.1, p.64-72, 1994.

PINHEIRO, A.L.; CARNEIRO, N.S.; VIEIRA, A.L., *et.al.* Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 20, p.23-26, 2002.

POSTEN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S.; FRCPC; ARNDT, K.A.; SILAPUNT, S. AND ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.**, v. 31, p. 334-340, 2005.

PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras.**, v.17, n.4, p.307-313, 2003.

ROCHA J.R. A.M.; DE OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; DE ANDRADE, L.C.F.; AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An Bras Dermatol.**, v.81, n.2, p.150-156, 2006.

ROCHKIND S, ROUSSO M, NISSAN M. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med.**, v.9, p.174-8, 1989.

ROMANO AC, ESPANA EM, YOO SH, BUDAK MT, WOLOSIN JM, TSENG SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.44, n.12, p.5125-5129, 2003.

SAFAVI, S.M.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; FALLAH, A.; MODARRESI, A.; MIR, M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingival. **Lasers Med Sci.** v.23, p.331-335, 2008.

SAYGUN, I.; KARACAY, S.; SERDAR, M.; URAL, A. U.; SENCIMEN, M.; KURTIS, B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.** v.3, p.211-215, 2008.

- SCHOFIELD R. The stem cell system. **Biomed Pharmacother.**, v.37, n.8, p.375-380, 1983.
- SOBANKO, J.F.; ALSTER, T.S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in human: a review and discussion. **Dermatol Surg.**, v.34, p.1-10, 2008.
- THOFT RA. The role of the limbus in ocular surface maintenance and repair. **Acta Ophthalmol Suppl.**, v.192, p.91-94, 1989.
- THOFT, R.A.; FRIEND, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v.24, n.10, p.1442-1443, 1983.
- THOMAS, D.W.; O'NEILL, I.D.; HARDING, K.G. Cutaneous wound healing: a current perspective. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.53, p.442-447, 1995.
- VINCIGUERRA, P.; CAMESASCA, F.I.; RANDAZZO, A. One-year results of butterfly laser epithelial keratomileusis. **J Refract Surg.**, v.19, n.2 Suppl, p.S223-S226, 2003.
- WILSON SE, HE Y-G, WENG J, LI Q, MCDOWALL AW, VITAL M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for theinterleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization. **Exp Eye Res.**, v.62, n.4, p.325-327, 1996.
- ZANG, Y.; SONG, S.; FONT, C-C.;TSANG, C-H.; YANT, M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with light. **J Invest Dermatol.**, v.120, p.849-857, 2003

ANEXO A Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.ºA095/CEP/2007, sobre “Aplicação de laser de baixa potência em despitelização corneana” sob a responsabilidade de *Renato Amaro Zângaro* foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 10 de setembro de 2007.



PROF. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap