

23

CAPÍTULO

PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DOS *LASERS* E SUAS APLICAÇÕES

Antônio L. B. Pinheiro
Paulo F. de Almeida
Luiz Guilherme P. Soares

23.1 INTRODUÇÃO

A luz, desde os primórdios da civilização, vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas. O uso da helioterapia foi amplamente baseado em crenças religiosas e superstições. Os homens pré-históricos endeusaram o sol e conseqüentemente a luz solar, os quais foram considerados sagrados, sendo a eles atribuída a capacidade de afastar maus espíritos capazes de provocar doenças. Os deuses solares da Antiguidade eram considerados deuses da saúde e da cura.

Devido à baixa qualidade dos relatos referentes ao emprego da helioterapia, sua eficácia é de difícil julgamento. Contudo, dados vindos das literaturas grega e romana mencionam que essa modalidade terapêutica foi utilizada largamente no tratamento da epilepsia, artrite, asma e obesidade. Nessas culturas, o banho de sol era tido como uma atividade saudável e um método de medicina preventiva, como reconhecido por Heródoto no século VI a.C.

Simultaneamente à adoração das várias formas de agentes emissores de luz, esta foi utilizada pelos seres humanos de forma terapêutica e científica.

Cientistas renomados dedicaram seus estudos à luz, como sir Isaac Newton, a ponto de a física destinar um capítulo da sua área do saber aos estudos luminosos, a óptica. A óptica integrou o processo a partir do momento em que a luz passou a ser entendida como a própria natureza. A luz é um fenômeno essencial à vida do nosso planeta. Sobretudo, é ela que, quando provém do sol, e incidindo nas plantas, desencadeia o processo da fotossíntese. A planta não poderia viver sem luz; a vida animal não poderia existir sem a planta e, principalmente, sem a fotossíntese, que se opera na vegetação verde.

Compõe-se a luz de corpúsculos denominados fótons, os quais se propagam em ondas transversais. O fóton é uma partícula subatômica desprendida por átomos e dotada de alta energia luminosa, e diferenças de energia resultam em diferentes cores. A propagação da luz no vácuo é sempre igual, isto é, se processa sempre à mesma velocidade. A última medição da velocidade da luz, efetuada em 1956, foi de 299.792,4 Km/s.

Quando a luz atravessa substâncias materiais, seus raios sofrem ligeiro retardamento, de acordo com o meio e também o ângulo de saída. Por mais simples, as indagações da ciência pedem respostas difíceis e demoradas. Para a pergunta “o que é a luz?”, os cientistas tiveram que escrever grossos tratados, realizar inúmeras experiências e formular diferentes hipóteses.

A compreensão do fato de que nossas sensações visuais proviam da luz retida pelos corpos foi revolucionária e rendeu à óptica estudos mais detalhados de fenômenos considerados de origem divina. O eletromagnetismo e a mecânica quântica aliaram-se à óptica no subsídio à exploração da luz nas diversas áreas do conhecimento humano. Dentro da física, a óptica é um campo que lida não somente com a propagação da luz, mas também com a sua produção e, principalmente, com seus mecanismos de interação com a matéria.

Nos meios homogêneos e transparentes, a luz propaga-se em linha reta. A propagação é facilmente observada no nosso cotidiano, por exemplo: num feixe de luz proveniente de um holofote; em qualquer processo de alinhamento óptico; em mira para atirar em um alvo; na formação de sombras; na formação de imagens; entre outras situações. Em meios heterogêneos, a luz não se propaga necessariamente em linha reta. Como exemplos, temos a atmosfera terrestre, cuja densidade aumenta conforme decresce a altitude. Em consequência disso, os raios provenientes dos astros se encurvam ao se aproximarem da superfície terrestre, fenômeno conhecido como refração atmosférica. Esse fenômeno é conhecido como princípio da propagação retilínea da luz.

A propagação da luz independe da existência de outros raios luminosos na região que estes atravessam. Esse princípio pode ser observado quando

um palco é iluminado por dois feixes de luz provenientes de dois holofotes. A trajetória de um dos raios não é modificada pela presença do outro, ou seja, cada um segue sua própria trajetória, como se o outro não existisse. Esse aspecto é explicado pelo princípio da independência dos raios de luz.

Outro princípio é o da reversibilidade dos raios luminosos, no qual se considera que um raio faz um percurso qualquer tanto na reflexão quanto na refração. Se o raio de luz seguir o percurso no sentido contrário, a trajetória do raio será a mesma. Esse princípio também é conhecido como princípio do caminho inverso, que pode ser enunciado da seguinte forma: “A trajetória seguida pelo raio luminoso independe do sentido do percurso”.

No século XIX, vários métodos destinados a melhorar os resultados da fototerapia foram introduzidos, dentre os quais o uso de lentes para focalização da luz solar e o uso de caixas de vidros onde pacientes eram colocados para receberem os raios solares. Downes e Blunt demonstraram que algumas bactérias eram destruídas pela luz, sendo esse achado o precursor do uso das radiações ultravioletas (UV) para esterilização, tal qual usado nos dias atuais. Posteriormente, vários tipos de lâmpadas foram testadas como fontes de luz UV, e estas serviram de base para a actinoterapia, dissociando-se, assim, a fotomedicina da luz solar como fonte da radiação.

Como com quase tudo de importante que ocorreu na física no século XX, o personagem principal para a óptica foi Albert Einstein. Foi ele quem primeiro sugeriu que um feixe de luz não seria apenas uma onda eletromagnética, com suas características usuais de frequência, amplitude e fase. Para explicar certos fenômenos que atormentavam os físicos da época, como por exemplo o efeito fotoelétrico, Einstein propôs que a luz seria composta por entidades discretas (isto é, separadas e distintas entre si), com uma energia proporcional à frequência da onda luminosa: os fótons.

Como dita a óptica, a luz é uma onda. E os fótons? Os fótons são ambivalentes. Apresentam tanto características típicas de uma onda (frequência, amplitude, fase e polarização) como também de uma partícula (momento e localização espacial). Os físicos chamam isso de “dualidade onda-partícula” e garantem, com base na experiência, que essa dupla personalidade faz parte da natureza da luz.

A origem do *laser* é discutida. O primeiro *maser* (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*) ou *laser* foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960, embora tenha sido Einstein, em 1916, quem propiciou o desenvolvimento teórico do *laser*, com a publicação de seu tratado *Zur Quantum Theorie der Strahlung*. Foram Schawlow e Townes os enunciadores dos princípios segundo os quais todos os *lasers* operam. Contudo, Townes,

Basov e Prokhorov receberam o prêmio Nobel em 1964, de modo que foi creditado a eles o desenvolvimento da teoria das emissões espontânea e estimulada de radiação.

Os princípios que regiam a física do *laser*, antes de 1916, restringiam-se aos princípios de interação da matéria até então conhecidos. A teoria da emissão estimulada proposta por Einstein baseou-se na teoria quântica proposta por Planck em 1900. Esta última discutiu as relações entre as quantidades de energia liberadas por processos atômicos.

O trabalho de Einstein, por sua vez, versou sobre a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnética em termos da absorção e emissão espontânea de radiação. Com a aplicação de princípios termodinâmicos, Einstein concluiu que o terceiro processo de interação, a emissão estimulada, deveria existir, e nela a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico. Contudo, outros autores atribuem ao físico americano Gordon Gold o desenvolvimento desse fantástico sistema de seleção de ondas, que permitiu a obtenção de um feixe de luz altamente concentrado.

O sistema foi batizado por Gold de *LASER*, abreviatura para a expressão inglesa *light amplification by stimulated emission of radiation* (ou, em português, amplificação de luz por emissão estimulada), que viria a propiciar ao mundo a abertura de novas fronteiras, revolucionando a ciência em diversos campos, desde a microcirurgia até a exploração espacial.

Embora tenha sido a proposição do terceiro princípio que levou Schawlow e Townes a descreverem os princípios do *maser*, foi Gordon Gold quem fez a primeira aplicação com sucesso da emissão estimulada de micro-ondas. Em 1960, Maiman conseguiu, pela primeira vez, a emissão estimulada de radiação. Esta estava localizada na faixa visível do espectro visual, e foi obtida pela excitação de uma roda de rubi (λ 1 694 nm) com pulsos luminosos intensos, resultando na geração do primeiro raio *laser* com emissão no espectro vermelho.

O *laser* é uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, que, em contato com os diferentes tecidos, resulta, de acordo com o tipo do *laser*, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares. Sendo uma forma de energia não ionizante, ao contrário de outras formas de radiação usadas terapêuticamente, como, por exemplo os raios X, gama e de nêutrons, a radiação *laser* não é invasiva na grande maioria dos comprimentos de onda utilizados com finalidade terapêutica, sendo muito bem tolerada pelos tecidos.

23.2 LASER VERSUS LUZ

O fenômeno físico chamado luz é bastante conhecido de todos que gozam da propriedade de ver. São características primárias da luz a sua intensidade e a cor. A intensidade de um feixe luminoso está associada ao número de fótons por segundo que chegam a uma determinada área. O olho humano é capaz de detectar luz de intensidade de apenas uns poucos fótons por segundo focalizados através da íris. A mesma retina que detecta tal nível mínimo está capacitada a detectar intensidades da ordem de um trilhão de fótons por segundo sem danos permanentes.

A sensação de cor existe graças à capacidade que o olho humano tem de diferenciar fótons de diferentes energias. A região do vermelho (menor energia) sensibiliza pouco o olho humano, enquanto a região do verde é a que melhor o sensibiliza. Por outro lado, as frequências que correspondem ao ultravioleta e ao infravermelho não causam sensação de visão.

O raio *laser* é um raio de luz; portanto, caracteriza-se primariamente por cor e intensidade. O que faz o raio *laser* diferente da luz comum são certas propriedades inerentes a um fenômeno chamado amplificação de luz por emissão estimulada. Qualitativamente, podemos entender a física desse fenômeno através do modelo simplificado que se segue. Para tal, iniciamos recordando a mecânica da geração de luz comum por um sistema atômico ou molecular qualquer.

Um raio de luz, como o proveniente de uma lâmpada ou do sol, é o resultado de várias transições eletrônicas espontâneas de níveis de energia previamente excitados para níveis de energia mais baixos. Esses níveis representam estados energéticos permitidos de um sistema atômico ou molecular qualquer e são quantizados. Por tratar-se de processo espontâneo, cada transição ocorre sem nenhuma correlação com as demais e, como resultado, temos milhões de “trens de onda” de cerca de um metro de comprimento, viajando com altíssima velocidade em todas as direções e sem qualquer relação de fase.

Quando um elétron é promovido para um estado excitado, ele tende a permanecer em tal estado por um tempo médio que é característico do sistema ao qual pertence. A volta desse elétron para o estado fundamental é, portanto, imprevisível, e no máximo podemos afirmar que a emissão de fótons, decorrente de tal volta para o estado fundamental, ocorrerá preferencialmente dentro de um tempo médio característico do sistema. A este fenômeno chamamos “emissão espontânea”.

Já o raio *laser* é ordenado, isto é, as emissões provenientes de cada átomo são forçadas a ocorrer em uma única direção, e, além disto, em instantes de tempo determinados pela “ordem” externa, configurando uma “emissão estimulada”. É possível ter uma visão leiga desse fenômeno acreditando na seguinte assertiva: “Um átomo excitado poderá emitir radiação antecipadamente caso um fóton, proveniente de outro átomo semelhante, passe por ele. A emissão dar-se-á durante tal passagem, e o novo trem de onda incorporar-se-á ao trem de onda excitador, aumentando seu comprimento e aumentando sua amplitude na região em que os dois coincidirem”.

Agora que já sabemos da existência de um tipo menos comum de emissão de radiação, ou seja, a estimulada, podemos falar sobre as propriedades particulares do *laser*, entendendo, então, a sua origem.

A primeira aplicação do *laser* em medicina foi uma mera substituição de equipamentos básicos em uma técnica já conhecida da oftalmologia – a fotocoagulação. A substituição da lâmpada de xenônio por um *laser* trouxe fabulosos benefícios para os tratamentos de fundo de olho, graças, principalmente, ao que chamaremos de “primeira propriedade do *laser*”, que é a alta colimação de seu feixe.

A “segunda propriedade particular” dos *lasers* refere-se à sua possibilidade de fornecer altas densidades de potências de radiação, o que não deixa de ser, também, uma consequência direta da colimação. Em princípio, se arranjar-mos um número muito grande de átomos, teremos no final do percurso um pulso de luz muito intenso, e, se tivermos uma maneira de transferir energia continuamente para os átomos, fazendo-os voltar sempre para o estado excitado, teremos a manutenção dos pulsos colimados, ou seja, teremos uma fonte contínua de luz de potência elevada que pode ser focalizada em área diminuta.

A energia (E) eletromagnética é normalmente medida em joules (1 joule equivale a 0,24 calorias), enquanto a potência (P) é medida em Watts. Uma potência de 1 Watt significa que a fonte está emitindo 1 Joule em cada segundo, ou seja:

$$\text{(Equação 23.1)} \quad 1 \text{ Watt} = 1 \text{ Joule} / 1 \text{ segundo} = \text{Joule} / \text{s}$$

Portanto:

$$\text{(Equação 23.2)} \quad P = E / t$$

em que t é o tempo gasto para transferir a energia E . Já densidade de potência, cuja unidade é Watt/m^2 , por definição, depende da área (A) que recebe a energia radiante, sendo expressa da seguinte maneira:

$$\text{(Equação 23.3)} \quad D \text{ (densidade de potência)} = P/A$$

A “terceira propriedade particular” da luz *laser* é a monocromaticidade, ou melhor, o alto grau de monocromaticidade da radiação. Essa propriedade decorre do fato de a radiação *laser* ser produzida por um conjunto de centros idênticos que participam sempre com a mesma transição eletrônica, emitindo fótons iguais. Casos específicos existem, também, em que um determinado equipamento *laser* pode emitir diferentes feixes *laser*, cada um com sua cor definida. É importante observar que apenas enumeramos as leis por motivos didáticos, pois sua ordem é irrelevante.

23.3 FOTOTERAPIA: UM PANORAMA DAS APLICAÇÕES DA LUZ EM DIVERSOS PROCESSOS BIOLÓGICOS

A biotecnologia se aprimora a cada avanço em suas plataformas associadas à inovação nos processos biológicos. A biotecnologia industrial engloba diversos setores: alimentício, farmacêutico, cosmético, agricultura, na saúde de forma geral, dentre outros. A utilização da luz como ferramenta terapêutica para inúmeras doenças vem ganhando espaço na biotecnologia industrial, não apenas na área médica e estética, mas também no melhoramento de métodos eficientes de detecção de micro-organismos patogênicos ou não, por exemplo. Os estudos relacionados à fototerapia nesse campo do conhecimento ainda são incipientes.

Uma técnica muito comum para verificar células sanguíneas é a microdissecação. Estudo de Fink (2003)⁴⁰ demonstrou que essa técnica aliada à manipulação assistida por *laser* mostrou-se eficiente na acurácia para detectar células sanguíneas, as quais poderiam ser plaquetas ou não. Para a contagem de células sanguíneas, os analisadores automatizados passaram por avanços, os quais determinam hoje com maior eficiência a diferenciação dessas células, a partir da propriedade de dispersão da luz, a absorbância. Atualmente, os analisadores incluíram a citometria de fluxo fluorescente, que fornece a contagem diferencial através do *laser*.

Estudos iniciais sobre biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos foram realizados a fim de analisar o processo de biodegradação

desses compostos por micro-organismos, utilizando para quantificar a liberação de gás carbônico (CO₂) a metodologia da absorção na luz infravermelha. Dessa forma, é possível analisar e verificar que determinados micro-organismos promovem alterações metabólicas diferentes quando crescem sobre o petróleo, através da luminescência induzida a *laser*.

A aplicação do *laser* já foi efetuada para aprimorar a técnica de diagnóstico conhecida como amplificação fágica para detecção de micro-organismos em amostras de alimentos. O princípio da técnica envolve a utilização de milhões de partículas fágicas sobre uma amostra, de modo que se os micro-organismos estiverem presentes na amostra, os fagos infectarão as células específicas e as partículas fágicas excedentes serão neutralizadas por aplicação de *laser* e uma substância fotossensibilizadora. Dessa forma, transferindo-se a amostra contendo os micro-organismos infectados para um meio em placa com culturas reveladoras, ocorrerá a formação de placas de lise, as quais podem ser quantificadas, de modo a representar a quantidade de micro-organismos presentes na amostra original. O tipo de *laser* e fotossensibilizador devem ser selecionados para não afetar as células a serem detectadas e os micro-organismos reveladores⁹¹; isto é, somente podem afetar os vírus que estiverem livres.

A utilização da luz *laser* em métodos de detecção de organismos como bactérias e leveduras vem ocorrendo em diversas pesquisas. Para detectar micro-organismos deteriorantes da cerveja, por exemplo, destaca-se a citometria de fluxo, que utiliza tecnologia a *laser* e métodos de coloração para a detecção de micro-organismos em líquidos escoando através de um pequeno orifício. O uso do equipamento que detecta com maior sensibilidade o CO₂ pode auxiliar no entendimento dos processos metabólicos realizados pelos micro-organismos na biorremediação e biodegradação de substâncias dispersas no solo.

A tecnologia *laser* vem sendo largamente utilizada em experimentos com materiais biológicos, com o objetivo de averiguar a possibilidade de utilização desse equipamento para análises nos setores de agricultura, veterinária e alimentos, através da análise das imagens geradas pelo *laser*. Oliveira¹¹⁷ pesquisou a viabilidade de sementes, umidade do solo, umidade de sementes, análise da qualidade de sêmen animal, entre outras, buscando inserir a técnica *laser* em pesquisas relativas às ciências agrárias, devido ao seu potencial na detecção de diferenças na atividade biológica dos materiais.

O avanço nas técnicas laboratoriais em análises clínicas é de grande necessidade, uma vez que permitirá a minimização de alíquota coletada, com os riscos biológicos ocupacionais, minimização de custos de análise,

conscientização ambiental e rapidez e precisão analítica. Em estudo recente²⁵, foi observado que o uso de tecnologias limpas de análise, como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy* – FT-IR), associada aos métodos de análise multivariada, é capaz de detectar alguns fungos como a *Candida sp.* a partir de pouca biomassa.

As técnicas de microscopias confocal de varredura a *laser* (do inglês, *confocal laser scanning microscopy* – CLSM) e de imagem da vida de fluorescência (do inglês, *fluorescence lifetime imaging microscopy* – FLIM) são capazes de fornecer informações importantes sobre a concentração e a distribuição espacial de um fluoróforo dentro de uma amostra, uma vez que essa molécula tem um tempo de decaimento da fluorescência característica que varia em função dos microambientes. Ao aplicar essas técnicas sobre biomassa pode-se, por exemplo, investigar a degradação de lignina e celulose. Essa aplicação será de grande importância para o desenvolvimento de métodos úteis às biorrefinarias para a geração de diversas substâncias químicas e biocombustíveis, bem como para a busca de fontes que substituam o petróleo na indústria petroquímica.

Ainda sobre o processo de detecção de micro-organismos, o uso da luz *laser* tem ganhado destaque nas análises de estrutura e mensuração de aglomerados celulares, como visto no trabalho de Ronnest e colaboradores¹⁵⁰, que demonstra a importância da difração *laser* como instrumento de comparação com a análise de imagem de grupos celulares de *Streptomyces coelicor*.

O avanço tecnológico dos aparelhos de microscopia eletrônica trouxe maior acurácia na identificação de estruturas em dimensão molecular. Uma técnica que utiliza a luz monocromática e tem ganhado espaço em estudos de verificação de estruturas químicas e moleculares é a espectroscopia Raman. Algumas pesquisas demonstram que essa é uma das técnicas eficientes de análises de biomateriais como ossos, por exemplo. Jabłoński⁷² verificaram ossos de ratos que haviam recebido estrôncio, para tratamento da osteoporose, de modo que essa substância poderia estar presente em diferentes formas químicas. O estudo foi realizado com o auxílio de outras técnicas de análise.

A detecção de compostos tóxicos em resíduos industriais torna-se cada vez mais importante, a fim de evitar o acúmulo de metais pesados, por exemplo, e outros compostos nocivos a micro-organismos de interesse industrial (algas). A espectroscopia induzida por *laser* vem sendo utilizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade e seletividade em águas residuais industriais, para o controle de íons metálicos. Essa característica da técnica

poderá se estender à monitorização da produção em massa de biocombustíveis comerciais e à indústria alimentícia.

A investigação em biotecnologia constitui um campo bastante amplo para acompanhar as possibilidades oferecidas pela aplicação da tecnologia fotônica, combinando diversas áreas técnicas, incluindo fontes e sensores de luz, bem como tecnologia de bioensaios.

Na biotecnologia industrial, a ação do *laser* pode ser descrita através da produção de metabólitos secundários de fungos. Siqueira¹⁶³ observara a ação de um *laser* de baixa intensidade na produção de compostos de um dermatófito *Trichophyton rubrum*, fungo causador de dermatomicoses. A partir desse estudo, notou-se a importância do *laser* GaAlAs. Este apresentou efeitos no metabolismo celular e alteração de morfologia e da taxa de crescimento da colônia *in vitro*.

23.4 FOTOTERAPIA: UM PANORAMA DAS APLICAÇÕES DA LUZ NA SAÚDE

A luz vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas há muito tempo, desde os primórdios. Relatos de 1400 a.C relevam o uso de combinações de plantas e luz solar para o tratamento de doenças como vitiligo e psoríase. Em razão da evolução de conceitos e teorias a respeito da luz, que passa por cientistas renomados como Hertz em 1887, Planck em 1890 e Einstein em 1905, estudos cada vez mais específicos vêm sendo realizados com o auxílio da luz.

Atualmente, a fototerapia monocromática (*laser* e LED) tem sido empregada nos tratamentos de icterícia, em reparo e cicatrização de lesões como mucosite e herpes; em articulações, como nas disfunções temporomandibulares (DTM) e nevralgias; na estética, através da remoção de tatuagens e na luta contra o envelhecimento. Recentemente, uma nova modalidade vem surgindo: a terapia fotodinâmica (TFD), que utiliza corantes fotossensíveis com o objetivo de atingir determinadas células-alvo, de modo a eliminá-las, podendo ser utilizada no tratamento do câncer ou contra micro-organismos.

23.4.1 Fotobiomodulação *laser*

A absorção da luz *laser* pelos tecidos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico. Por causa do grande número de efeitos clínicos que esses processos ocasionam, eles podem ser

subdivididos de acordo com a sua manifestação clínica. No grupo dos efeitos fotoquímicos podemos incluir a biomodulação, que é o efeito da luz *laser* sobre processos moleculares e bioquímicos que normalmente ocorrem nos tecidos, como, por exemplo, a cicatrização de feridas e o reparo ósseo¹²⁸.

A fototerapia *laser* possui uma capacidade, dependente do comprimento de onda, de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento significativo. A dispersão da luz *laser* no tecido é muito complexa, pois os componentes do tecido influenciam a dispersão da luz. Os efeitos da fototerapia *laser* nos ossos ainda são controversos, com estudos anteriores mostrando resultados diferentes ou conflitantes. É possível que o efeito da fototerapia *laser* sobre a regeneração óssea dependa não só da dose total de irradiação, mas também do tempo e modo de irradiação¹⁰¹.

Foi demonstrado em vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, que a fotobiomodulação *laser* (FBML) no nível celular estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, resultando no aumento do metabolismo e produção de energia, consequentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial e iniciando uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico, a angiogênese, macrófagos e linfócitos; a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno; a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, entre outros, acelerando, assim, o processo de reparação óssea¹⁴¹.

No reparo ósseo, estudos demonstraram que a fototerapia *laser* na faixa do infravermelho próximo (FTL-IVP) é a mais adequada, devido à sua maior profundidade de penetração no tecido, quando comparada com a fototerapia *laser* emitida no espectro visível da luz. Seus resultados indicam que a área óssea irradiada com FTL-IVP apresenta proliferação dos osteoblastos, deposição de colágeno e neoformação óssea. Sabe-se que esse efeito estimulador sobre os ossos ocorre durante a fase inicial da proliferação de fibroblastos e osteoblastos, bem como durante a fase inicial de diferenciação de células mesenquimais. A proliferação fibroblástica e o aumento de sua atividade foram observados previamente em indivíduos irradiados e culturas de células, sendo este o fator responsável pela grande concentração de fibras de colágeno vistas dentro do osso irradiado^{53-56,138-140}.

23.4.2 Fotobiomodulação LED

A terapia com luz é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pelos humanos. O uso dos LEDs como fontes de luz viria a ser o próximo passo no desenvolvimento tecnológico da terapia com luz⁸⁰.

LED é a sigla, em inglês, para *light emitting diode*, que em português significa diodo emissor de luz. Esse tipo de emissão é diferente dos *lasers*, que produzem emissão estimulada e amplificada de radiação. Inicialmente, se atribuía os efeitos do *laser* à coerência, mas foi mostrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam bons resultados⁸¹.

O uso da fototerapia LED cresceu após resultados positivos demonstrados pela fototerapia *laser* na melhora do reparo ósseo em vários modelos^{109,112,113}, porém ainda há poucos relatos sobre o uso da fototerapia LED nesse processo, principalmente quando da sua associação aos biomateriais. Experimentos em dimensão celular evidenciaram que tanto a luz coerente como a não coerente, nos mesmos comprimentos de onda, intensidade e tempo de irradiação, promovem efeitos biológicos semelhantes^{83,84}. O sucesso do uso do LED em várias áreas confirma essa afirmação^{17,19}.

O aumento na deposição de colágeno após a irradiação com LED foi documentado em culturas de fibroblastos e em modelos humanos nos quais foi observada também a diminuição da colagenase¹⁹ na cicatrização tecidual em modelos de queimadura de terceiro grau cicatrizantes e em lesões bolhosas humanas¹⁸. Há evidências de que a luz produzida por LEDs, nos mesmos comprimentos de ondas bioestimulatórios de estudos anteriores com o *laser*, tem efeitos bioquímicos similares.

Estudos recentes mostram que a fototerapia LED induz um processo de reparo mais rápido, com presença de osso neoformado de boa qualidade. Essas características são observadas em diversos estudos nos quais foi utilizada a fototerapia *laser* com parâmetros semelhantes. Parece provável que os efeitos benéficos do LED são similares àqueles do *laser*. É possível que o mecanismo envolvido seja similar, com a absorção da luz pelo citocromo-C-oxidase presente na membrana mitocondrial. Apesar do crescimento das aplicações bem-sucedidas da fototerapia LED em diversas áreas, seu uso no reparo ósseo e associado a enxerto de biomateriais precisa ser mais estudado^{109,112,113}.

A fototerapia na icterícia consiste na colocação do neonato sob uma fonte de luz fluorescente. A luz absorvida degrada a bilirrubina impregnada na pele, transformando-a em derivados hidrossolúveis que serão eliminados. A eficácia desse tratamento depende da intensidade da luz emitida pelos aparelhos, de ter espectro de emissão próximo ao da absorção da bilirrubina, da idade pós-natal do recém-nascido (RN), da idade gestacional, do peso de nascimento, da causa da icterícia e do valor de bilirrubinemia no início do tratamento.

De acordo com os resultados de Leal e colegas⁸⁷, a terapia com *laser* HeNe apresentou boa resposta em relação ao reparo tecidual. Ainda nesse estudo, os efeitos biológicos do *laser* de baixa potência têm sua função baseada em um processo fotobiológico, que consiste na absorção molecular de energia luminosa depositada e transformada em energia vital. A literatura pertinente ao tema reparo tecidual e os experimentos realizados por Lins e colegas⁹² parecem indicar claramente a ocorrência de múltiplos efeitos bioestimulantes mediados pelo *laser*, inclusive eventos celulares (proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica, elevada síntese colagênica, diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, movimentação celular dos leucócitos, fibroblastos e células epiteliais e aumento da atividade fagocitária dos macrófagos) e vasculares (angiogênese e vasodilatação), que desempenham importante papel na aceleração do processo de reparo de tecidos injuriados.

Os resultados obtidos por Minatel e colaboradores¹⁰⁴ corroboram as evidências de que a fototerapia por meio de LEDs a λ 600 nm a 1.000 nm promove o reparo tecidual. Ainda sobre LED e reparo tecidual, Meyer e colegas¹⁰³ concluíram que o emprego da fototerapia não colimada verde (λ 515 nm a 525 nm) e vermelha (λ 620 nm a 630 nm), durante seis minutos, produziu resultados qualitativos na formação da cicatriz de segunda intenção (que ocorre quando uma ferida apresenta as margens afastadas e forma-se um grande coágulo). Entretanto, faz-se necessária a realização de mais pesquisas que utilizem o LED em comprimentos de onda fora do espectro vermelho e infravermelho³².

A deficiência de ferro (anemia) prejudica a formação da hemoglobina, bem como o transporte de oxigênio. O processo de cicatrização envolve inúmeras funções, muitas das quais são dependentes da presença de oxigênio. Com base nos resultados de Sampaio e colaboradores¹⁵⁵, o *laser* melhora a angiogênese, aumenta o suprimento de sangue, a proliferação e a função de células. Além disso, concluíram que a utilização de luz LED λ 700 \pm 20 nm causou um significativo impacto positivo de biomodulação da proliferação de fibroblastos sobre animais anêmicos, e a irradiação com *laser* (λ 660 nm) foi mais eficaz em aumentar a proliferação em animais não anêmicos.

De acordo com sua pesquisa realizada em ratos albinos, machos e idosos, Couto²⁹ verificou que o tratamento com a luz coerente e não coerente favorecem o processo de reparo epitelial, sendo que os animais tratados com a luz não coerente (LED) no comprimento de onda do λ 640 \pm 20 nm apresentaram melhores resultados quando comparados com a luz coerente (*laser*) no comprimento de onda λ 660 nm.

A mucosite oral (MO), uma lesão que ocorre na superfície da mucosa oral, é muito desconfortável, passível de sofrer infecções secundárias e comprometer o estado de saúde geral do indivíduo⁴⁸. Afeta, principalmente, pacientes com câncer e os que são submetidos a transplantes, devido às altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia⁶⁶. A prevenção e o tratamento da mucosite oral têm sido empírica e amplamente afetadas pela higiene oral, por medicações como analgésicos, antibióticos e anti-inflamatórios e pelo próprio sistema imunológico do paciente. A terapia com *laser* de baixa intensidade produz cicatrização de feridas, e o uso profilático desse tratamento parece reduzir a incidência de lesões severas de MO^{66,71}.

No trabalho de Volpato¹⁸³, houve uma baixa na incidência da mucosite oral, independentemente da fonte de luz utilizada. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados com *laser* e LED sobre a incidência e severidade da mucosite oral, utilizando o mesmo protocolo em ambos os casos.

O herpes simples é uma infecção ulcerativa mucocutânea de característica crônica, que pode ser recorrente e que tem como agente etiológico duas cepas do vírus herpes simples (HSV). O herpes labial é de interesse estomatológico porque representa uma das viroses que mais frequentemente acomete a cavidade bucal. O uso de antivirais tópicos ou sistêmicos ainda é amplamente recomendado para o tratamento das lesões; entretanto, tem-se observado a emergência de estirpes resistentes a alguns antivirais. O *laser* terapêutico de baixa intensidade e potência atuam como anti-inflamatório e analgésico, que, somados ao seu poder bioestimulante, diminui o desconforto logo após a primeira aplicação e acelera a reparação, promovendo bem-estar e melhora na qualidade de vida desses pacientes.

Park e colegas¹²⁰ realizaram uma pesquisa em 28 pacientes com herpes-zóster, uma doença provocada por uma variante do herpes-vírus, que causa lesões cutâneas e dor intensa. Nesse estudo, pode-se observar que o grupo de pacientes tratados com fototerapia LED alcançou uma cicatrização mais rápida do que o grupo controle. Também foi constatada a redução da dor, provavelmente devido ao efeito anti-inflamatório atribuído ao LED.

Segundo a Academia Americana de Dor Orofacial, a disfunção temporomandibular (DTM) é definida como um conjunto de distúrbios que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e estruturas associadas. Dentre os sintomas, os mais relatados são dores na face, na articulação temporomandibular (ATM) e/ou nos músculos mastigatórios, dores na cabeça e na orelha, além de zumbido, plenitude auricular e vertigem.

Baseado no estudo de Frare e Nicolau⁴⁹, 20 pacientes com DTM foram selecionados e submetidos à fototerapia utilizando o *laser* de baixa potência de arseniato de gálio (λ 904 nm). Pode-se concluir que a fotobiomodulação do *laser* promove resultados satisfatórios no controle do quadro doloroso de pacientes com DTM, podendo ser indicada como método eficaz e não invasivo. Outros autores corroboram estes resultados, ressaltando o alívio da dor e o restabelecimento da função promovidos pela fototerapia^{8,129}. Porém, os autores sugerem que novos estudos sejam realizados, principalmente para o esclarecimento do protocolo terapêutico.

A síndrome da fibromialgia caracteriza-se por rigidez e dores no sistema musculoesquelético de intensidade variada e difusa, com múltiplos pontos dolorosos. A etiologia ainda é desconhecida; a condição parece ser uma forma de reumatismo crônico, mas não inflamatório. Carvalho e colegas²³ realizaram uma pesquisa na qual quatro pacientes com diagnóstico firmado de fibromialgia foram submetidos a duas aplicações de LED por semana, nas regiões dolorosas e no ponto de acupuntura C7, durante quatro semanas, totalizando oito sessões. Todos os pacientes apresentaram diminuição da dor após as aplicações do LED, com redução das regiões dolorosas.

De acordo com a Associação Internacional de Estudo da Dor, a nevralgia do trigêmeo é uma neuropatia definida como uma dor facial crônica, de curta duração, lancinante, recorrente, geralmente unilateral, devido a uma desordem do quinto nervo craniano. Causa episódios de dor intensa nos olhos, lábios, nariz, cabeça e mandíbula. Devido à presença de muitos pacientes com resistência à intervenção farmacológica, algumas opções não medicamentosas têm sido estudadas. O *laser* terapêutico pode ser utilizado em vários procedimentos clínicos para tratamento da dor e mediação dos processos inflamatórios com cura acelerada, sendo uma modalidade altamente eficaz no tratamento da dor facial intratável, assim como na nevralgia trigeminal.

A terapia a *laser* ganhou muita popularidade no tratamento de lesões pigmentadas da pele e tatuagens. Ela trabalha com o princípio da fototermólise seletiva, gerando pulsos ultracurtos de alta energia e potência, com um efeito fotoacústico adicional. O comprimento de onda de λ 1064 nm é seletivamente absorvido pelos cromóforos, tais como partículas de tinta e melanina.

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é determinado geneticamente; e o envelhecimento extrínseco, também chamado fotoenvelhecimento, ocorre por exposição à radiação ultravioleta. Patriota e colegas¹²¹ realizaram uma pesquisa com 26 mulheres, com idades entre 40 e 65 anos,

submetidas à aplicação da luz intensa pulsada. Concluíram que a luz intensa pulsada constitui boa opção de tratamento para o fotoenvelhecimento cutâneo, sendo uma técnica não ablativa, segura e eficaz.

O uso da fototerapia terapêutica como uma modalidade na dermatologia é uma boa opção hoje em dia. Através de um estudo da prevalência das dermatoses encaminhado à unidade de fototerapia, Casara e colegas²⁴ comprovaram a importância de avaliar a relevância da manutenção e atualização dessa modalidade terapêutica.

Na dermatologia pode-se classificar os *lasers*, de acordo com as suas funções e aplicações clínicas, em:

- 1) *Lasers* de corte e de vaporização.
- 2) *Lasers* vasculares.
- 3) *Lasers* pigmentares.
- 4) *Lasers* depilatórios.
- 5) *Lasers* de rejuvenescimento não ablativo.

Têm diversas indicações, tais como em angiomas e hemangiomas, verrugas virais, remoção de tatuagens, na acne, na medicina estética com o rejuvenescimento e, mais recentemente, na terapia fotodinâmica.

Através de um ensaio clínico, 10 mulheres entre 48 a 65 anos de idade (média de 57,5 anos) foram selecionadas e submetidas a 20 sessões de LED, duas sessões por semana, com luz vermelha λ 630 nm por 30 minutos. Concluiu-se que o tratamento com LED para o rejuvenescimento foi bastante eficiente em relação ao grau de melhora.

Vale ressaltar que os resultados obtidos com a laserterapia para prevenir e/ou melhorar as rugas não podem ser comparados com resultados de cirurgias plásticas ou outros métodos curativos. A utilização desse *laser* de CO₂ (não abrasivo/não invasivo) corresponde à realização de um *peeling* térmico, no qual a luz emitida agirá de maneira mais efetiva depois da segunda sessão, pois só assim ele terá capacidade de penetrar profundamente, tornando-se cada vez mais eficaz quanto à melhoria do aspecto cutâneo.

23.5 LASERTERAPIA NOS PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO E REPARO

O limiar de sobrevivência da célula depende do tecido em que está localizada e do seu estado fisiológico. O *laser* de baixa intensidade tem a

propriedade de estimular a membrana plasmática e as membranas mitocondriais, induzindo a célula à biomodulação, ou seja, estimulando o estado de normalização da região afetada. Esse tipo de terapia passou a ser chamado de laserterapia. Quando a laserterapia é usada no espectro eletromagnético visível, existe uma fotobioestimulação inicial na mitocôndria, a qual ativa uma cadeia de eventos biológicos. Quando a irradiação ocorre no espectro infravermelho, há estímulo dos canais da membrana plasmática, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana, temperatura e gradiente de pressão. Tanto a luz visível quanto a infravermelha podem ser absorvidas por diferentes componentes da cadeia respiratória celular, como os cromóforos na citocromo-C-oxidase ou porfirinas, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais superóxido.

A radiação emitida pelos *lasers* em baixa potência tem demonstrado efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes, sendo, por isso, bastante utilizada no processo de reparo tecidual. São observados os efeitos terapêuticos de morfodiferenciação e proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução do edema, maior regeneração celular, aumento da microcirculação local e permeabilidade vascular. Portanto, a terapia a *laser* apresenta-se como uma alternativa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e necessidade de regeneração tecidual.

O processo de reparo constitui uma reação tecidual dinâmica, que abarca os seguintes fenômenos: inflamação, proliferação celular e síntese de elementos constituintes da matriz extracelular, incluindo as fibras colágenas, elásticas e reticulares. A absorção molecular da luz *laser* permite um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e síntese de colágeno. A aceleração da microcirculação resulta em alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários.

23.5.1 Reparação tecidual tendínea

O tecido tendíneo, classificado como tecido conjuntivo denso, é a interface entre o tecido contrátil e o não contrátil e tem como função transmitir a força produzida pelo músculo para o osso, tornando possível o movimento articular^{6,124}.

O tendão é constituído por células (fibroblastos) e matriz extracelular, na qual estão imersas proteínas fibrosas de colágeno e elastina, proteoglicanas,

glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O colágeno é o maior componente da matriz extracelular, compreendendo cerca de 90% do peso úmido do tendão. Os tendões consistem em feixes paralelos de fibras colágenas firmemente agrupadas, tendo entre elas fileiras de fibroblastos formando um tecido denso e modelado, orientando as fibras do tendão e tornando-o resistente a uma resposta tensora. Os feixes de colágeno do tendão, denominados feixes primários, se agrupam com feixes menores, denominados feixes secundários, onde são envolvidos por tecido conjuntivo frouxo contendo poucos vasos sanguíneos e nervos, que dão suprimento aos tendões. Por haver baixa vascularização, oxigenação e nutrição, o tendão possui baixa capacidade de regeneração.

Lesões do tecido conjuntivo, como ruptura do tendão e tensões ligamentares, são comuns, principalmente entre atletas. Ao contrário da maioria dos tecidos moles, cujo tempo de reparo dura em média de sete a dez dias, os tendões necessitam de pelo menos seis semanas. Essas lesões são causa de preocupação para os cirurgiões que irão reconstruí-los, pois a sutura de um tendão é uma das mais decepcionantes intervenções cirúrgicas, devido à formação frequente de aderências nesse tipo de tecido, impedindo que o tendão recupere sua função. Durante esse período, geralmente o paciente é imobilizado para evitar rupturas, o que causa inúmeras complicações funcionais, retardando o processo de reabilitação. Portanto, torna-se necessária a elaboração de estudos com o objetivo de melhorar o reparo tendíneo, reduzindo o tempo de recuperação, de imobilização e o retorno às atividades rotineiras.

Arruda e colaboradores⁶ estudaram a influência da terapia *laser* de baixa intensidade na organização das fibras de colágeno durante o reparo do tendão calcâneo de ratos. Para isso, os autores utilizaram 37 ratas da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com cinco semanas de idade, como cobaias. A lesão foi realizada, após anestesia, no terço médio do tendão calcâneo, onde foi feita a tenotomia total por cisalhamento transversal. Para tratamento da lesão, foram utilizadas duas fontes de luz nos seguintes parâmetros: um diodo GaAs, com comprimento de onda λ 904 nm e potência de pico de 15 W, pulsado na frequência de 2000 Hz, dose de 3 J/cm², diâmetro do feixe de 0,07 cm², duração de pulso de 180 ns, resultando em um tempo de aplicação de 9 segundos; e um diodo de AlGaInP com λ 670 nm e potência de 30 mW, contínuo, dose de 3 J/cm², área do feixe de 0,02 cm² resultando em um tempo de aplicação de 6 segundos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo GA (n = 8): submetido à irradiação pelo *laser* infravermelho (GaAs); grupo GB (n = 8): submetido à irradiação *laser* vermelho (AlGaInP); grupo

GAB (n = 8): irradiação com a associação dos dois tipos de *laser*, resultando em um tempo de aplicação total de 15 segundos; grupo GP (n = 7): controle sem lesão e não tratado; grupo GCL (n = 6): lesado e submetido a um tratamento placebo.

A terapia *laser* teve início 24 horas após a tenotomia e constou de 12 sessões consecutivas e ininterruptas, realizadas por meio da técnica de contato, num ângulo de 90° em relação à superfície da área lesada. Dois dias após a última sessão, os animais sofreram eutanásia e seus tendões foram retirados para análise da birrefringência. Os melhores resultados foram obtidos no grupo GAB, tratado com a associação dos dois tipos de *laser*, o que permite inferir uma sinergia de ação dos *lasers* vermelho e infravermelho próximos no reparo do tecido conjuntivo no tendão de ratos.

Em outro estudo recente, publicado em 2005 por Salate et al.¹⁵³, cujo objetivo era analisar o efeito de diferentes irradiâncias na angiogênese, um componente essencial do tecido de reparação, em rupturas parciais de tendão de Aquiles de ratos, um total de 96 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foram utilizados. As cobaias foram igualmente subdivididas em grupos submetidos ao tratamento com *laser* em três, cinco e sete dias ou para tratamento placebo em três, cinco e sete dias pós-lesão, começando no mesmo dia da ruptura. Para a indução da lesão, os autores utilizaram um método distinto do utilizado no artigo anterior. O membro posterior direito foi colocado em tração, e o tendão de Aquiles foi posicionado no equipamento para fazer uma lesão parcial. Um peso de 186 g colocado 20 cm acima do animal caiu sobre o tendão numa energia potencial de queda de 364,9 mJ.

O tendão lesionado do grupo teste foi tratado em um único ponto com *laser* contínuo de InGaAlP, que emite luz com λ 660 nm de comprimento de onda, por um período de 10 segundos. Um dos grupos teste (24 animais) recebeu 10 mW de potência de saída, com uma dose de 2,5 J/cm² todos os dias, no mesmo período, durante três (n = 8), cinco (n = 8) e sete dias (n = 8) a partir do mesmo dia da lesão, cerca de seis horas depois. No segundo grupo teste (24 animais), a potência e a dose variaram e os outros parâmetros foram mantidos: 40 mW de potência de saída, com uma dose de 10 J/cm². Um grupo controle (n = 24) foi submetido a tratamento placebo, e o outro (n = 24) foi mantido nas suas respectivas gaiolas durante três (n = 8), cinco (n = 8) e sete dias (n = 8), sem qualquer intervenção.

Passadas 24 horas após o último tratamento, os animais foram sacrificados e os respectivos tecidos tendíneos foram analisados por meio da técnica histológica. Um total de cinco áreas de igual tamanho foi determinado, e

o número de vasos foi contado nessas áreas por um sistema de medição de vídeo. Os resultados indicam que o número de vasos estava acentuadamente aumentado em ratos tratados com *laser* em comparação com os dois grupos controle. O estudo mostrou que o *laser* de baixa intensidade de λ 660 nm foi eficiente no aumento da angiogênese, durante o reparo do tendão. No entanto, a resposta da irradiação em células parece ser dependente dos parâmetros utilizados. O tratamento com 40 mW durante 10 segundos promoveu aumento da neovascularização de partida depois de três dias de aplicação. Já o tratamento com potência de 10 mW mostrou mais vasos cinco dias após a irradiação. No sétimo dia, o grupo irradiado com 40 mW teve menor número de vasos do que o observado no quinto dia.

Diversos pesquisadores têm estudado várias modalidades terapêuticas com o objetivo de acelerar o processo regenerativo, e assim demonstraram que a fotobiomodulação, através da radiação *laser* de baixa intensidade com os diferentes comprimentos de onda, interação de diferentes formas no reparo tendíneo, com efeitos positivos⁶. A utilização de diferentes metodologias e parâmetros durante os experimentos dificultam uma comparação mais acurada entre os trabalhos, o que repercute numa dificuldade de padronização na prática clínica.

23.5.2 Reparação tecidual cutânea

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal, e representa a interface do organismo com o ambiente externo. Esse órgão cutâneo recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituído de duas camadas originadas de dois folhetos germinativos distintos. A epiderme é o tecido epitelial de superfície, derivado do ectoderma cutâneo. A derme é a camada mais profunda, constituída de tecido conjuntivo denso, não modelado, derivado do mesoderma. A rede de tecido conjuntivo embrionário, ou mesênquima, derivado do mesoderma, forma o tecido conjuntivo da derme. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da pele, mas a mantém unida aos órgãos.

Com múltiplas funções, este grande órgão atua na função de proteção do organismo contra agentes físicos, químicos e infecciosos, além de prevenir a eliminação excessiva de água por evaporação, ou o seu ganho. Funciona como sistema refrigerador, uma vez que as glândulas sudoríparas secretam

um fluido para resfriar o corpo, enquanto os pelos e uma camada subjacente de gordura isolam contra o frio.

Diante de um trauma tecidual ocorre uma série de eventos vasculares, celulares e bioquímicos que serão responsáveis pela substituição das células mortas ou danificadas por células saudáveis, ocorrendo, assim, o processo de reparação tecidual. Esse processo de reparação não é completamente regenerativo, pois o fechamento da ferida pelo tecido cicatricial restabelece a integridade dérmica, mas faltam folículos pilosos e outros apêndices dérmicos, o que leva a um padrão desorganizado de deposição de colágeno e menor resistência do tecido em relação à pele íntegra¹⁷⁵.

Tazima et al.¹⁷⁴ reúnem os principais eventos envolvidos no reparo de feridas, sendo estes divididos em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa (que incluem re-epitelização, síntese da matriz e neovascularização) e fase de maturação. Segundo os autores, o primeiro processo no reparo tecidual inicia com a fase inflamatória, que, de início, envolve a formação do coágulo através das plaquetas, hemácias e fibrina trazidas com o sangramento. O coágulo tem como finalidade criar uma barreira contra a contaminação. Com a lesão tecidual há a liberação de vários mediadores, tais como fator de ativação de plaquetas, fator de crescimento, serotonina, adrenalina e fatores do complemento, entre outros. Essa fase dura cerca de três dias e é de vital importância para o processo de cicatrização.

A fase proliferativa é caracterizada pela formação de tecido de granulação, constituído por um leito capilar fibroblasto, macrófagos, um fraco arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Essa fase é composta de três eventos importantes: neoangiogênese, que é processo de formação de novos vasos sanguíneos, necessários para manter o ambiente de cicatrização da ferida; fibroplasia, que consiste no surgimento dos fibroblastos no local da inflamação, que irão sintetizar o colágeno responsável pela sustentação e força tênsil da cicatriz; epitelização, que acontece entre as primeiras 24 a 36 horas, na qual ocorre a proliferação celular do epitélio. A epitelização envolve uma sequência de alterações nos ceratinócitos da ferida: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação. Assim, a matriz extracelular substitui rapidamente o coágulo depositado no leito da ferida logo após o trauma, tendo como principal função a restauração da continuidade do tecido lesado, funcionando como um arcabouço para a migração celular.

Segundo os mesmos autores, a fase de maturação está relacionada com o processo de contração da ferida, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada. Nessa fase ocorre uma remodelação do tecido cicatricial formado na fase anterior. O alinhamento das fibras é reorganizado a fim

de aumentar a resistência do tecido e diminuir a espessura da cicatriz, reduzindo a deformidade. A maturação da ferida tem início durante a terceira semana e dura toda a vida da ferida.

A cicatrização é um processo que tem sido muito estudado atualmente. Diversas pesquisas têm demonstrado a eficácia da estimulação através de luz na reabilitação funcional e estética da pele.

Entre os recursos mais utilizados nas últimas décadas, a fotobiomodulação pela luz vermelha ao infravermelho usando *laser* de baixa potência (LBT), ou *low level laser therapy* (LLLT), tem se mostrado como acelerador no processo de cicatrização de ferida. A fotobioestimulação promovida pelo *laser* de baixa potência tem sido empregada de maneira bastante eficaz, no pós-operatório de feridas cirúrgicas e no tratamento de lesões ulceradas, resultando em uma reparação tecidual mais rápida e com padrão de qualidade histológica superior.

Baldan e colegas¹² investigaram os efeitos de diferentes doses de *laser* de diodo (λ 670 nm) de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Os ratos foram divididos em quatro grupos: CG, grupo controle; G2, grupo 2, 0,06 J; G3, grupo 3, 0,15 J; G4, grupo 4, 0,057 J. A aplicação da radiação iniciava-se imediatamente após a cirurgia durante três dias consecutivos, sendo a área irradiada em 12 pontos do retalho cutâneo e avaliada após sete dias do pós-operatório. Os resultados mostraram que a irradiação com *laser* de diodo (λ 670 nm) de baixa intensidade, com oferta de 0,57 J de energia por ponto (densidade de energia de 20,36 J/cm²), influenciou positivamente a viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos.

Silva et al.¹⁶⁰ avaliaram a eficácia da laserterapia de baixa intensidade no processo inflamatório, a cicatrização e epitelização de enxertos cutâneos por sementeira em ratos. Vinte ratos foram submetidos a essa técnica de enxertia e divididos em dois grupos iguais, um tratado com *laser* (GL) e um controle (GC). O GL (n=10) recebeu no pós-operatório imediato, 72 horas depois e no sétimo dia, irradiação com *laser* de baixa intensidade 6 J/cm² /18 s em cada ponto enxertado. Os resultados demonstraram um menor tempo de reação inflamatória, maior velocidade de cicatrização, epitelização e queratinização nos animais tratados com *laser* em relação aos não tratados. Resultados positivos também foram encontrados por Neves e colegas¹¹¹ ao tratar com *laser* λ 830 nm (30 mW, 2,52 J, 36 J/cm², 84 segundos), retalhos cutâneos de ratos Wistar submetidos à nicotina.

Cury e colegas³³ avaliaram os efeitos da laserterapia de baixa potência na angiogênese por meio de três mediadores importantes (VEGF, HIF-1 α e MMP-2) em um modelo de retalhos isquêmicos de ratos, utilizando *laser* de

λ 660 nm e λ 780 nm em densidade de energia de 30 J/cm² e 40 J/cm². Sesenta ratos foram divididos em cinco grupos (SF-NI, grupo controle; SF-R30, λ 660 nm, 30 J/cm²; SF-R40, λ 660 nm, 40 J/cm²; SF-IV30, λ 780 nm, 30 J/cm² e SF-IV40, λ 780 nm, 40 J/cm²). A irradiação com *laser* foi realizada em 24 pontos, abrangendo os retalhos e a pele circundante, imediatamente após a cirurgia e durante sete dias consecutivos. Os resultados demonstraram que ambos os *lasers* λ 660 e λ 780 nm foram capazes de modular a secreção de VEGF, a atividade de MMP-2 e de expressão de HIF-1 α de um modo dependente da dose. Assim, a LBP pode melhorar a cicatrização de enxertos de pele, aumentando a quantidade de novos vasos formados no tecido.

Além desses citados acima, vários estudos experimentais, de diversos autores, avaliam a eficácia da aplicação de luz *laser* no estudo de cicatrização envolvendo a epiderme e derme.

Nos últimos anos, a fototerapia por luzes coerentes (*lasers*) destaca-se como método bioestimulador para o reparo tecidual, que aumenta a circulação local, proliferação celular e síntese de colágeno. Vários estudos clínicos avaliaram a fototerapia no tratamento de cicatrizes e reparo tecidual, mas diferem quanto aos tipos e dosimetrias utilizados (comprimento de onda, potência, intensidade). Apesar da atual discussão da luz, a dose de energia é uma interrogação para vários pesquisadores e clínicos. No que tange ao limiar energético de biomodulação, há várias controvérsias. Os *lasers* com diferentes doses de energia produzem determinados efeitos sobre os vasos sanguíneos da pele, que geram ceticismo a respeito da real eficácia na cicatrização tecidual.

Segundo Lins e colaboradores⁹², alguns estudos não especificam a dosimetria utilizada para promover os efeitos bioestimulantes, gerando, assim, resultados conflitantes. Portanto, as diferentes dosimetrias utilizadas pelos trabalhos de pesquisa devem ser comparadas a fim de formar protocolos de aplicação clínica, possibilitando a utilização desse agente terapêutico com maior conhecimento e adequadas indicações. Dessa forma, um número ainda maior de estudos é necessário para que seus resultados e as indicações de diferentes parâmetros do *laser* sejam comparados e possam ser bem empregados na clínica.

23.5.3 Reparo ósseo

Atualmente, o *laser* tem sido empregado nos mais diversos campos, principalmente na área médica, em cirurgias e na laserterapia para reparo ósseo e tecidual.

O osso é um tecido conjuntivo composto por 75% de fração inorgânica, que corresponde aos minerais, principalmente cristais de hidroxiapatita, e 25% de matéria orgânica, incluindo o colágeno e proteínas que são responsáveis pela elasticidade óssea. O tecido ósseo é formado por uma matriz intercelular calcificada na qual estão mergulhadas suas principais células: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Sua função é de grande importância para o ser vivo, pois sustenta e protege os órgãos do corpo, além de servir como alavanca para os músculos, impulsionando a movimentação, e como reservatório de íons cálcio.

Apesar da aparência rígida e resistente do osso, este está crescendo e remodelando-se constantemente, mantendo-se ativo. O osso possui um elevado potencial de regeneração. Ao ser lesionado por uma fratura, sua resposta resulta na cicatrização do tecido de maneira similar à que ocorre com sua estrutura inicial, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. Dessa forma, em condições normais, a maioria das fraturas não apresenta problemas de consolidação. No entanto, essa capacidade de reparo apresenta limitações na ausência de suprimento sanguíneo, na instabilidade mecânica e na presença de grandes defeitos.

Com o intuito de otimizar a regeneração natural do tecido ósseo ou em outras situações que acarretam um aumento da fragilidade óssea, intervenções físicas, como o *laser* terapêutico de baixa potência (LLLT), têm sido estudadas com a finalidade de estimular a consolidação de fraturas através da aceleração da osteointegração ou osteogênese.

A absorção da radiação proveniente do *laser* de baixa potência pelo tecido ósseo provoca efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Em seguida, efeitos indiretos são desencadeados, como o estímulo à microcirculação e ao trofismo celular, além de efeitos terapêuticos, os quais incluem efeito analgésico, anti-inflamatório, antiedematoso e estimulante do trofismo dos tecidos.

As pesquisas existentes na literatura científica demonstram que a irradiação do *laser* de baixa potência em tecidos lesionados, como é o caso do tecido ósseo, desencadeia efeito positivo no processo de regeneração, além de relatar também maior número de vasos sanguíneos e proliferação de células como fibroblastos. Entretanto, também existem estudos nos quais tecidos

irradiados com o *laser* de baixa potência não sofreram alterações ou ainda sofreram efeitos negativos à sua regeneração. Isso ocorre porque a composição e estrutura dos tecidos são diferentes, necessitando de doses e períodos de irradiação específicos. Resultados positivos somente serão obtidos a partir de técnicas corretamente aplicadas e doses selecionadas individualmente, visto que doses muito baixas não provocam efeitos e, em contrapartida, doses elevadas podem provocar danos ao tecido irradiado.

Pinheiro e colegas¹³⁴ buscaram avaliar histologicamente o efeito do *laser* de baixa potência sobre o reparo ósseo de defeitos padronizados em fêmures de ratos Wistar albinos submetidos a implante de osso bovino inorgânico Gen-ox[®]. Nesse estudo os ratos foram divididos em três grupos: o grupo I (controle, n = 6), grupo II (Gen-ox[®], n = 09) e grupo III (Gen-ox[®] + LLLT, n = 09). A primeira irradiação ocorreu logo após a cirurgia, e então a cada 48 horas, transcutaneamente. Quatro pontos em torno da ferida eram irradiados com 4 J, ao todo 16 J por sessão. Os sacrifícios foram realizados 15, 21 e 30 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram que irradiação com *laser* de baixa intensidade (λ 830 nm) promoveu reparo ósseo mais avançado nos espécimes irradiados em relação aos não irradiados.

Como citado anteriormente, algumas pesquisas também demonstram que a radiação com *laser* de baixa potência pode atuar de maneira ineficaz, como é o caso do estudo feito por Riso e colegas (2010)¹⁴⁷. A intenção desse trabalho foi avaliar a densidade mineral óssea (DMO) em osteotomias transversais incompletas em tíbias de ratos Wistar. Estes foram divididos em três grupos: g I (n = 10), referência 15 dias; g II (n = 10), suspenso pela cauda e tratado com *laser* por 12 dias; e g III (n = 10), suspenso pela cauda por 36 dias, sendo que após o 21^o dia iniciou-se tratamento com *laser* por 12 dias. O *laser* utilizado foi de Ga-Al-As, DMC – Flash Lase III[®], com comprimento de onda λ 830 nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm², 40 segundos de aplicação em 12 sessões. Os resultados não foram satisfatórios em nenhum dos grupos, demonstrando a ineficácia da terapia *laser* no processo de reparação óssea.

Weber e colegas¹⁸⁸ estudaram os efeitos histológicos da laserterapia de baixa intensidade associada a enxertos autógenos de osso sobre a regeneração de defeitos ósseos. Sessenta ratos Wistar foram utilizados em quatro grupos: G1, como grupo controle; G2, com aplicação de *laser* diretamente sobre a loja cirúrgica; G3, fototerapia *laser* sobre o enxerto; G4, com fototerapia *laser* sobre o enxerto e a loja cirúrgica. O protocolo utilizado para fototerapia *laser* (λ 830 nm, Φ = 0,5 cm², 50 mW, 10 J/cm²) foi de 10 J/cm² divididos em quatro pontos, aplicados em dias alternados por 15 dias. Os animais foram mortos 15, 21, e 30 dias após as cirurgias. Nos grupos em

que a fototerapia foi utilizada nos leitos cirúrgicos (G2 e G4) durante o transoperatório, a remodelação óssea foi quantitativa e qualitativamente mais evidente quando comparados com os grupos G1 e G3.

Pinheiro e colegas¹²⁷ realizaram um estudo para avaliar o efeito de fotobiomodulação do *laser* infravermelho sobre a incorporação de hidroxiapatita (HA; $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$) e a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes dentários, através de espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Foram utilizados 14 coelhos que receberam implantes de titânio na tíbia; oito deles foram irradiados com *laser* de $\lambda 830 \text{ nm}$ (sete sessões a cada 48 horas de intervalo, $21,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto, 10 mW , $\Phi = 0,0028 \text{ cm}^2$, 86 J por sessão) e seis serviram como grupo controle. Os animais foram sacrificados 15, 30 e 45 dias após as cirurgias. Os espécimes foram preparados adequadamente para a espectroscopia Raman e a microscopia eletrônica de varredura, e as devidas leituras do osso ao redor dos implantes foram realizadas. Os resultados mostraram resultados significativos na concentração de hidroxiapatita entre os espécimes do grupo irradiado e do grupo controle 30 e 45 dias após as cirurgias.

Gerbi e colegas⁵⁵ realizaram um estudo para avaliar histologicamente o efeito da fotobiomodulação *laser* no reparo ósseo de defeitos criados em fêmur de ratos *Wistar albinus* tratados ou não com proteínas ósseas morfogenéticas (em inglês, *bone morphogenetic proteins* – BMPs) e membranas bovinas orgânicas. A fototerapia *laser* ($\lambda 830 \text{ nm}$, 40 mW , $\Phi = 0,6 \text{ mm}$) totalizou 16 J/cm^2 por sessão. Os animais foram mortos nos períodos de 15, 21 e 30 dias. Os pesquisadores obtiveram resultados, referentes aos grupos irradiados em relação aos não irradiados, que evidenciaram, histologicamente, um incremento na deposição de fibras colágenas (15 e 21 dias), bem como uma quantidade aumentada de osso trabeculado bem organizado no final do período experimental de 30 dias. Concluiu-se que o uso de BMPs e membranas bovinas possui um efeito sinérgico aos efeitos fotobiomoduladores do *laser* no processo de reparo ósseo.

Em um estudo anterior utilizando um biomaterial diferente, Lopes e colaboradores⁹⁴ avaliaram a intensidade da HA fosfatada ($\sim 958 \text{ cm}^{-1}$) em animais com fraturas completas tratados com fixação interna rígida (FIR) associada ou não a fototerapia *laser* e associada ou não a BMPs e regeneração óssea guiada (ROG). Para avaliação dos dados, foi utilizada análise por espectroscopia Raman, e os autores concluíram que a utilização de fototerapia *laser* associada a BMPs e ROG foi eficaz na melhora da reparação óssea em ossos fraturados devido ao aumento dos níveis de HA observado⁷⁴.

Pinheiro et al.¹³⁴ afirmaram que o uso da fototerapia LED associada ao MTA, BMPs e regeneração óssea guiada foi eficaz na melhora do reparo ósseo, quando utilizados os parâmetros LED (λ 850 \pm 10 nm, 150 mW, Φ = 0,5 cm², densidade de energia de 16 J/cm², dose total do tratamento de 112 J/cm²), com aplicações repetidas a cada 48 horas. Os resultados foram obtidos através de espectroscopia Raman, que avaliou os picos referentes ao conteúdo inorgânico (\sim 958 cm⁻¹) e ao conteúdo orgânico (\sim 1447 cm⁻¹). Os autores afirmaram, ainda, que o avanço na maturação óssea visto nos grupos irradiados está ligado ao aumento na deposição de colágeno. Esse fato está associado a habilidade dos osteoblastos irradiados em secretarem mais HAC.

Recentemente, Pinheiro e colegas (2013)¹⁰⁹ avaliaram, através de espectroscopia Raman, o reparo de fraturas cirurgicamente confeccionadas, tratadas com FIR, associada ou não com fototerapia *laser* (λ 780 nm, 50 mW, 16 J/cm², Φ = 0,05 cm², emissão contínua); associado ou não a enxerto de fosfo-cerâmica bifásica e β -trifosfato de cálcio e ROG. A espectroscopia Raman mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Grupo FIR + enxerto + fototerapia *laser* mostrou valores mais elevados, e grupo FIR + biomaterial, mais baixos. Em conclusão, os resultados da investigação foram clinicamente importantes, pois a análise espectral do componente ósseo (\sim 958 cm⁻¹) evidenciou aumento dos níveis de HA em locais fraturados usando a associação da luz de *laser* a um enxerto de cerâmica.

23.5.4 Reparo do tecido nervoso

Dentre as diversas patologias em que a laserterapia tem sido inserida, como traumatismos musculares, articulares, ósseos e cutâneos, existe também o tratamento com *laser* de baixa potência em nervos.

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central e periférico. Inseridos no sistema periférico encontram-se os nervos, cuja principal função é fazer o transporte de impulsos nervosos entre os órgãos e o sistema nervoso central. Dentre os nervos destaca-se o nervo ciático, que é o maior e mais longo do corpo humano, originando-se na coluna lombar, atravessando a região pélvica através da musculatura, descendo através da nádega, quadril, parte posterior da coxa, atrás do joelho e, depois disso, seguindo em pequenos ramos pela parte posterolateral da panturrilha seguindo até o pé. O nervo ciático é parte do sistema nervoso, e é responsável por transmitir dor e sensibilidade (núcleo especializado em coluna).

Assim como ocorre em outros tecidos, os nervos periféricos são estruturas que também estão suscetíveis a algum tipo de dano ou lesão, podendo sofrer incapacidade motora e sensorial importante. Tais lesões podem ser: ferimentos cortantes, por arma de fogo, traumas por alterações de temperatura, compressões, mecanismos de tração e ainda devido a causas infecciosas e tóxicas, sendo que pode haver diferentes mecanismos como laceração, avulsão, secção, estiramento, compressão e esmagamento. Essas lesões acabam comprometendo a integridade do tecido, produzindo disfunções importantes nas estruturas inervadas pelo nervo lesado, pois implicam alterações da condução nervosa e no transporte axonal. Em alguns casos, o elevado tempo de duração da regeneração nervosa pode acarretar incapacidades vitalícias. Buscando o retorno precoce da funcionalidade, o *laser* de baixa intensidade vem sendo utilizado com o intuito de acelerar o processo de regeneração do nervo afetado¹³.

A laserterapia de baixa intensidade é utilizada em várias pesquisas clínicas e experimentais nas lesões do SNP por ocasionar um estímulo na microcirculação, por meio da paralisação dos esfíncteres pré-capilares, provocando a vasodilatação de arteríolas e capilares, e por meio da neoformação vascular, levando, assim, a um aumento do fluxo sanguíneo na área irradiada. Também é empregada na cicatrização de vários tecidos, por estimular um aumento na produção de ATP celular, provocando aceleração na atividade mitótica celular. Nos estudos recentes sobre a influência do *laser* de baixa intensidade nas lesões do SNP, utilizam-se diferentes modelos, variando quanto aos comprimentos de onda (λ 632 nm a 904 nm), energia, densidade, tempo de intervenção, mecanismo e tipo de lesão, além de tratamento e forma de avaliação, funcional e morfométrica.

Diversas pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de determinar os parâmetros e tipos de estimulação que possam acelerar a regeneração e a recuperação funcional do nervo periférico, visando minimizar futuras disfunções.

O estudo realizado por Oliveira e colegas¹¹⁸ avaliou a ação precoce do *laser* de baixa potência juntamente com a ação do ultrassom no processo de regeneração de uma lesão em ratos. Um número de 24 ratos foi utilizado, sendo que 18 foram submetidos à cirurgia de lesão do nervo e três grupos de seis foram divididos da seguinte forma: o grupo I, controle, lesado, sem intervenção terapêutica; grupo II, intervenção terapêutica do *laser* ArGaAl (40 mW, 4 J/cm²); e grupo III, intervenção terapêutica do ultrassom pulsado. As intervenções terapêuticas foram iniciadas após 24 horas da lesão com

aplicações diárias durante 14 dias. Os resultados evidenciaram que a recuperação nervosa foi maior com a aplicação do *laser*.

De acordo com a literatura científica, a laserterapia também pode ocorrer de maneira ineficaz no tratamento de nervos ciáticos danificados, como no estudo realizado por Reis¹⁴⁶. Nesse trabalho, objetivou-se acelerar os processos regenerativos para poder analisar a influência da aplicação do *laser* de arsenieto de gálio e alumínio (λ 660 nm) sobre a recuperação funcional do nervo ciático de ratos. Um número de 12 ratos Wistar foi submetido a lesão e, em seguida, dividido em dois grupos de seis, um sendo o controle e o outro referente ao uso da terapia. Após a lesão, utilizou-se o *laser* de GaAlAs (λ 660 nm, 4 J/cm², 26,3 mW, feixe de 0,63 cm²), em três pontos equidistantes sobre a lesão, por 20 dias. Através desse estudo, pode-se concluir que os parâmetros e métodos empregados na laserterapia demonstram resultados nulos sobre o cálculo do índice funcional do ciático (IFC) no período avaliado.

Podemos, então, destacar os seguintes efeitos do *laser* no reparo tecidual: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo à produção de colágeno; a inibição secretória de alguns mediadores químicos; a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local. A laserterapia tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos observados na terapia farmacológica, inibindo e/ou diminuindo a concentração de prostaglandina ES2 (PGE2), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e histamina. Além disso, o aumento do fluxo sanguíneo local melhora a acidose e, simultaneamente, promove a liberação e remoção de substâncias algicas.

A ação angiogênica associada ao incremento da atividade fibroblástica e de macrófagos parece ser o efeito mais animador dos *lasers* de baixa intensidade para o processo de cicatrização. A laserterapia tem sido usada há mais de 30 anos, e mais de 90% da literatura disponível relata efeitos positivos. Na presente revisão, evidenciou-se o efeito benéfico do *laser* na cicatrização e reparo tecidual, o que permite a aplicação da laserterapia como mecanismo coadjuvante ou alternativo de tratamento de diferentes tipos de lesão nos tecidos biológicos. Contudo, a consagração do *laser* como terapia exige um conhecimento da energia aplicada, uma investigação dos efeitos que produz no organismo e a aplicação de uma correta metodologia, além do estabelecimento de padrões de dosimetria de referência para cada tecido.

23.6 LASERS E SEU EFEITO ANTIMICROBIANO

Desde o surgimento das luzes do tipo *laser*, no século XX, as possibilidades do uso terapêutico da luz têm se ampliado a cada dia em todas as áreas do conhecimento humano. De acordo com sua interação com os tecidos irradiados, os *lasers* podem ser classificados em dois grandes grupos: os *lasers* cirúrgicos, ou que operam em alta potência, e os *lasers* não cirúrgicos, também conhecidos como *lasers* terapêuticos ou que operam em baixa potência. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) passaram a ser utilizados na área médica alternativamente ao uso de *lasers* convencionais. Os LEDs são dispositivos semicondutores que, quando polarizados adequadamente, emitem luz na faixa visível ou invisível. Embora tanto os *lasers* quanto os LEDs produzam luzes monocromáticas, os LEDs apresentam menor colimação e coerência, resultando geralmente em bandas de emissão mais largas, o que pode ser uma vantagem quando a complementaridade por um fotossensibilizador é desejada.

Com relação ao efeito das luzes na redução da microbiota presente, sabemos que esse efeito é altamente influenciado pelo tipo de luz utilizada. Atualmente, a ação antimicrobiana dos *lasers* que operam em alta potência está bastante estabelecida quanto ao fato de que as luzes atingem a superfície irradiada com altas temperaturas promovendo a esterilização local por ação térmica. Os *lasers* de baixa potência, por sua vez, têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual, sendo reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e anti-inflamatória sobre tecidos duros e moles. Esses efeitos são gerados por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos em vez de efeitos térmicos, não apresentando, dessa forma, efeito antimicrobiano quando utilizados isoladamente.

No caso específico da terapia fotodinâmica, o efeito antimicrobiano pode ser atingido quando uma droga fotossensibilizadora é ativada por uma luz de baixa intensidade (*laser* ou LED), gerando substâncias que podem danificar e, em último caso, matar a célula alvo. Essa terapia foi inicialmente idealizada para o tratamento do câncer, com base na observação de que algumas moléculas não tóxicas – chamadas de fotossensibilizadores, como os derivados das porfirinas –, se acumulam principalmente nas células malignas. Durante a terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador é inicialmente administrado ao paciente por via sistêmica, o que, por si só, não causa dano aos tecidos sadios ou doentes do hospedeiro. Entretanto, quando uma luz (usualmente um *laser*) é aplicada nos tecidos que contêm a droga, esta é ativada, e os tecidos irradiados são rapidamente destruídos.

De modo geral, os fotossensibilizadores são moléculas que possuem a propriedade especial de absorver energia luminosa e utilizar essa energia para promover reações químicas nas células e tecidos submetidos à terapia fotodinâmica. Para tanto, os fotossensibilizadores devem ser capazes de absorver luz no comprimento de onda da luz emitida pelo aparelho utilizado. Como a maioria das células não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um fotossensibilizador que atraia para si a luz e inicie a formação de radicais livres é importante. Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos, como o azul de metileno e o azul de toluidina. No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para serem clinicamente efetivos, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar danos tóxicos ao hospedeiro.

Durante a terapia fotodinâmica, os fotossensibilizadores em contato com as células-alvo passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores (Figura 23.1). Nesse estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular, iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocessos tipo II, Figura 23.2a), ou interagir com outras moléculas, como aceptores de elétrons, resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocessos do tipo I, Figura 23.2b). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células ou alterar sua atividade metabólica de maneira irreversível, resultando na morte da célula-alvo. Assim, a efetividade da terapia fotodinâmica combina dois princípios: o acúmulo preferencial de fotossensibilizador nas células-alvo e a irradiação precisa da luz, o que possibilita a ação seletiva e localizada da terapia.

A rápida emergência de resistência entre bactérias patogênicas tem levado a um interesse cada vez maior da comunidade científica em encontrar terapias antimicrobianas alternativas que, hipoteticamente, tornem o surgimento de espécies resistentes improvável. Exemplos dessas terapias incluem o uso de bacteriófagos, de peptídeos antimicrobianos e da terapia fotodinâmica. Estudos avaliando a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em micro-organismos resistentes a antibióticos e normais verificaram que ambas as

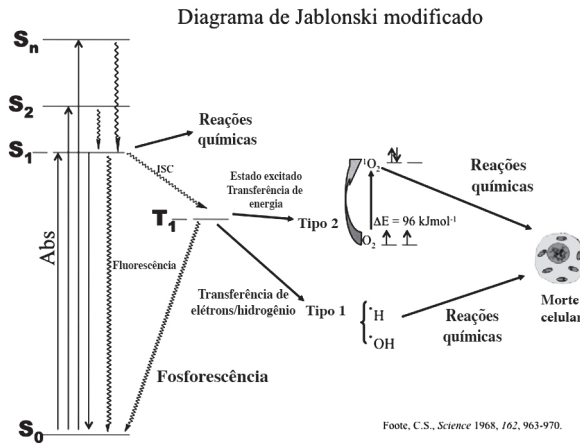


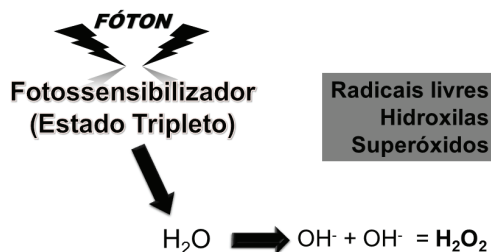
Figura 23.1 Diagrama de Jablonski modificado, demonstrando como um fotossensibilizador (FS), quando excitado por uma energia (E), sai de seu estado fundamental para um estado mais excitado, chamado singlete. Em seu estado singlete, a molécula poderá voltar ao seu estado fundamental (fluorescência) ou passar para um estágio intermediário denominado tripleto, e deste retornar ao seu estado fundamental (fosforescência). Em seu estado tripleto, o fotossensibilizador poderá reagir com as moléculas de O_2 presentes na vizinhança e desencadear as reações do tipo I e II, gerando produtos tóxicos e aumentando a citotoxicidade no interior das células tratadas.

cepas são suscetíveis a essa terapia quando a combinação apropriada de fotossensibilizador e luz é utilizada.

23.7 FOTOQUIMIOTERAPIA EM MICRO-ORGANISMOS

A fotoquimioterapia (*photochemotherapy*, em inglês) ou inativação fotodinâmica (*photodynamic inactivation* – PDI, em inglês), ou ainda quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (em inglês, *photodynamic antimicrobial chemotherapy* – PACT), são derivações da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana e utilizam desses químicos microbianos específicos (FS) que, quando iluminados, apresentam uma atividade muito intensa. A morte celular geralmente está relacionada com as espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo fotossensibilizador e o oxigênio *in situ*. Como a oxidação resultante de moléculas biológicas não é específica, pode-se imaginar que poderão ter consequências na parede celular bacteriana, ribossomos, DNA e/ou enzimas^{54,150}.

REAÇÃO FOTODINÂMICA TIPO I



REAÇÃO FOTODINÂMICA TIPO II



Figura 23.2 Esquema descritivo do fotoprocesso tipos II (a) e I (b).

A fotoquimioterapia já era utilizada em 1500 a.C. na Índia e no Egito, onde era comum o uso de extratos de plantas e posterior exposição à luz solar como forma de tratamento de vitiligo. Porém, cientificamente, o seu uso foi constatado já no século XX, em 1948, quando Fahmy et al., na Universidade do Cairo, isolaram três compostos químicos a partir do fruto de uma planta *Ammi majus*. Eles chamaram esses três compostos de *ammoidin* (8-methoxypsoraleno), *ammidin* e *majudlin* (5-psoraleno)³⁰. Com o aparecimento de micro-organismos resistentes a antibióticos, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), outro termo para PDI, funcionou como um método alternativo e se mostrou eficaz em bactérias, fungos, vírus e protozoários^{150,39}.

A fotoquimioterapia de micro-organismos tem sido considerada uma terapia relativamente nova, uma vez que começou a ser empregada com sistemática científica recentemente¹³³. Baseia-se numa derivação da terapia

fotodinâmica antitumoral, que é uma forma de tratamento cuja eficácia depende da produção e liberação de altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), após a administração tópica ou sistêmica de uma substância fotossensibilizadora, não tóxica e sensível à luz, seguida pela irradiação com uma luz visível em um comprimento de onda apropriado e na presença de oxigênio⁴³.

Porém, antes de 1400 a.C. os indianos deram início a essa terapia, visando ao tratamento do vitiligo, ao empregar um fotossensibilizador exógeno obtido de plantas (*Psoralenos*), usado na forma de uma loção aplicada sobre a pele e que era capaz de absorver a luz solar¹²⁸.

No início do século XX, Raab e Von Tappeiner, constataram acidentalmente que um meio de cultura contendo acridina diluída, quando exposto a uma luz intensa, apresentava, como consequência, a morte dos micro-organismos cultivados. Esses pesquisadores, em experimentos subsequentes, observaram que a associação do corante e da exposição à luz sobre os meios contendo os micro-organismos apresentava como resultado maior toxicidade, em relação àquela observada com o uso isolado de luz ou acridina. Postulou-se, portanto, que algum produto da fluorescência, e não a luz por si só, seria responsável pela elevada toxicidade observada¹²⁸.

Em 1913, Mayer-Betz fez uma autoinjeção de 200 mg do que ele pensava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito. Porém, ao se expor à luz, apresentou fotossensibilidade na pele por vários meses. Em 1924, ocorreu o primeiro relato de fluorescência espontânea de tumores induzidos experimentalmente com o auxílio de uma lâmpada de Wood. Nesse mesmo ano, Policard, postulou ser este fenômeno ocasionado pela porfirina¹²⁸.

Com o atual fenômeno da resistência aos antibióticos em diversas doenças infecciosas pelo mundo, o interesse por novas alternativas de tratamento vem se multiplicando. A fotoquimioterapia volta ao cenário de pesquisas como uma nova alternativa para o tratamento desses patógenos resistentes a fármacos, pois não existem relatos na literatura de micro-organismos resistentes à técnica, mesmo aqueles submetidos a vários ciclos de tratamento⁷⁷.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) também se baseia na junção de dois procedimentos: uma fonte de luz (meio físico) e um fotossensibilizador (meio químico). Com o objetivo de verificar o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) na desinfecção de águas contaminadas com *Escherichia coli*, utilizando diferentes fotossensibilizadores, foram realizados testes para determinar as melhores concentrações do fotossensibilizador para uso experimental. Os ensaios com micro-organismos mostraram efeitos inibitórios de crescimento e de mortandade (nas cepas de *E. coli*

estudadas) na presença de azul de metileno (AM) e verde malaquita (VM), com efeito altamente intensificado pela aplicação de luz, demonstrando que o sistema AM/LED e VM/LED podem ser uma alternativa para o controle de bactérias⁵⁶.

Na presença de oxigênio encontrado nas células, os fotossensibilizadores excitados podem reagir com moléculas de sua vizinhança através da transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação tipo I), ou pela transferência de energia para o oxigênio, levando à produção de oxigênio singleto (reação tipo II). Ambas as vias levam à morte das células ou tecido-alvo^{31,67}. As espécies reativas de oxigênio (EROs) atacam múltiplas moléculas responsáveis pelas mais variadas propriedades. A fotoquimioterapia não deve causar resistência às drogas utilizadas e merece atenção especial como uma nova estratégia para contornar esse problema tão comum encontrado no tratamento convencional de certas doenças³⁴.

A fotoquimioterapia é potencialmente segura, aplicável e oferece opções de tratamento para pacientes que sofrem de muitos problemas, se tornando uma outra opção de tratamento às quimioterapias tradicionais. Também não induz resistência aos micro-organismos e não necessita de inúmeras seções de tratamento¹². Segundo a Sociedade Americana de Câncer, vários fatores são favoráveis ao tratamento com fotoquimioterapia: quando realizada corretamente, não apresenta efeitos colaterais em longo prazo; é menos invasiva que uma cirurgia; normalmente é um procedimento muito rápido e pode ser realizado em ambulatórios; seu alvo de atuação pode ser muito preciso; caso seja necessário, a técnica pode ser repetida várias vezes, ao contrário da radiação; além de apresentar pouca ou nenhuma cicatrização local. Sua desvantagem consiste basicamente no alcance da luz, ou seja, a técnica só funciona onde a luz possa chegar.

A utilização da fotoquimioterapia para o tratamento de algumas infecções ainda apresenta certas limitações que precisam ser superadas para aplicações terapêuticas futuras significantes para o tratamento de doenças infecciosas, e a questão-chave consiste na melhor forma de entrega da luz e do fotossensibilizador às células-alvo. Além disso, é preciso determinar dosimetrias precisas, usando dispositivos de iluminação adequada com parâmetros bem definidos⁷⁷.

Tem sido proposto na literatura o uso da terapia fotodinâmica (TFD) para matar células microbianas, e um grande número de fotossensibilizadores e fontes de irradiação são reportados, em diferentes parâmetros e em diversas concentrações do corante. De acordo com a pesquisa de Prates e colegas¹⁴⁴, a TFD foi efetiva e apresentou aproximadamente 6 logs de morte

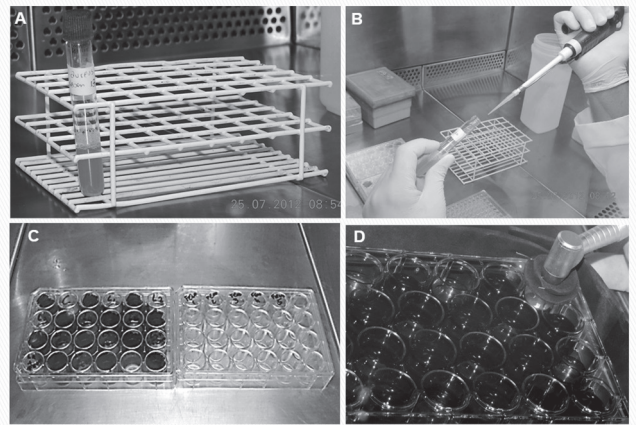


Figura 23.3 Metodologia da terapia fotodinâmica. (A) Cultivo celular. (B) Remoção da cultura celular para quantificação do inóculo inicial. (C) Organização e distribuição dos grupos em placas de 24 poços, alternados com poços pretos. (D) Irradiação dos grupos tratados.

celular em leveduras. Por outro lado, nem o fotossensibilizador ou a irradiação separadamente promoveram morte celular. Este resultado corrobora Queiroga¹⁴⁵, que utilizando a terapia fotodinâmica com azul de metileno e *laser* InGaAlP, promoveu a inativação significativa das espécies de *Candida* avaliadas (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*),

Para que a TFD possa ser usada contra micro-organismos, para combater infecções localizadas difíceis de tratar, é necessário que o fotossensibilizador seja capaz de ser administrado de forma local, tópica ou intracavidade e, depois de um tempo adequado, proceder à irradiação da área infectada com luz em dose e comprimento de onda adequados, com fibra ótica, ponta difusora e outros, ou por iluminação direta da área exposta cirurgicamente⁹⁸.

Uma descrição da técnica geral pode ser vista na Figura 23.3.

23.7.1 Fotoquimioterapia em bactérias

A bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* é uma causa muito comum de infecções em humanos. Estudo com o *laser* pulsado matriz-assistido (MAPLE) pode ser utilizado para o crescimento de filmes finos compostos por poly (D,L-lactide) PDDLA-gentamicina que apresentam propriedades antimicrobianas. Esse filme inibe com eficácia o crescimento de *S. aureus*,

pois evita que a bactéria em associação com outros micro-organismos forme biofilmes que são mais resistentes aos antibióticos²⁶.

O laser de diodo λ 809 nm combinado com a indocianina verde eliminou todas as cepas de bactérias, tanto selvagens quanto resistentes, de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto o fotossensibilizador ou o laser sozinhos não tiveram efeito letal⁹.

Já o laser de Nd:YAG aplicado durante 15 minutos se mostrou eficiente para matar uma quantidade considerável de micro-organismos, como, por exemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*. O laser de diodo AlGaInP e o corante azul de toluidina-O⁸⁵ (TBO) utilizados em culturas *in vitro* também reduziram a quantidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 61,53% em comparação ao grupo controle, enquanto em culturas de *Streptococcus sanguinis* essa redução foi ainda maior (84,32%)⁸⁴.

O LED azul, combinado com os fotossensibilizadores rosa de bengala ou

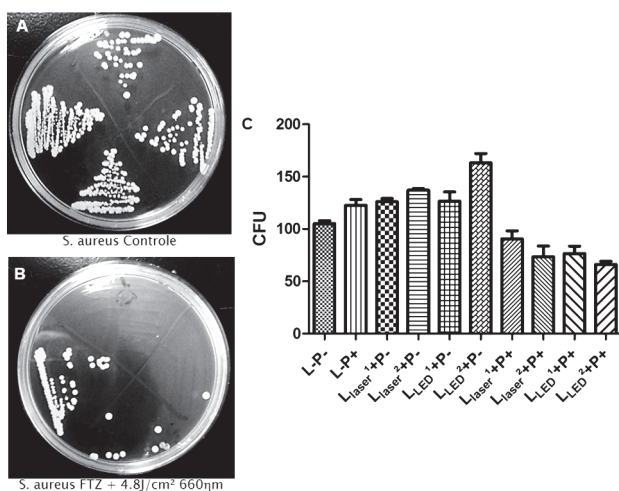


Figura 23.4 Resultados obtidos com a técnica em *S. aureus*. (A) Grupo controle demonstrando crescimento celular em todos os campos. (B) Grupo tratado com fenotiazina associada ao LED (4,8 J/cm²), demonstrando a eficácia do tratamento. (C) Gráfico de resultados.

eritrosina, reduziu a quantidade de biofilmes formados por *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mutans*⁹⁶. O tratamento das *Streptococcus mutans* também pode ser realizado a partir do uso combinado de Radachlorin® com o laser de HeNe de comprimento de onda λ 633 nm³⁹. Esse mesmo LED,

quando irradiou o FS (curcumina), foi eficaz contra *Candida albicans*, tanto planctônicas quanto o biofilme³³.

Outro *laser* de baixa potência, InGaAlP – Indium Gallium Aluminum Phosphide, com comprimento de onda de λ 660 nm, utilizado em conjunto com o azul de metileno, reduziu a quantidade de colônias dos micro-organismos causadores de cáries⁵⁸.

Além dos fotossensibilizadores já citados, eosina Y, curcumina e rosa de bengala, quando ativados pela luz azul (λ 450 nm a 500 nm), conseguiram reduzir as colônias de *Enterococcus faecalis* em cultivo líquido. Essa combinação em biofilme tornou-as completamente inviáveis. Já a luz azul, quando utilizada de forma individual, não teve nenhum efeito na cultura bacteriana⁹⁹.

A irradiação com luz visível de λ 405 nm teve efeito letal nos endósporos das bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*⁷⁷. Os endósporos bacterianos são muito resistentes aos tratamentos normalmente utilizados, como, por exemplo, o aquecimento.

Nosso grupo tem obtido resultados extremamente positivos na aplicação da técnica em bactérias, como pode ser visto na Figura 23.4.

23.7.2 Fotoquimioterapia em fungos

A TFD também é apresentada como uma solução alternativa para o tratamento de doenças causadas por fungos, como a *Candida*. Muitas vezes inofensiva na cavidade humana normal, espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, podem levar a infecções da mucosa como a candidíase orofaríngea⁷⁸. Destacando-se estudos voltados para *Candida albicans*, as infecções causadas por esses fungos podem ser graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos e debilitados (infectados pelo HIV; transplantados; portadores de linfomas; com deficiências nutricionais; com distúrbios metabólicos, como diabetes, neoplasias, xerostomia secundária à radioterapia, efeitos colaterais dos medicamentos, envelhecimento e síndrome Sjögren). Estudos têm relatado que infecções com diferentes tipos de *Candida*, em casos de pacientes com HIV, apresentam sintomas mais graves, isto é, são mais difíceis de tratar do que as infecções somente com um tipo de *C. albicans*^{78,115}.

Mang e colegas¹⁰⁰ demonstraram que o fotossensibilizador Photofrin® estimulado por TFD pode eliminar espécies de *Candida* com grande eficiência. Outras *Candida* isoladas de pacientes com AIDS que demonstraram

resistência ao fluconazol e anfotericina B foram igualmente suscetíveis à morte fotodinâmica. Desse modo, a utilização da TFD em pacientes já sensíveis por conta de outro quadro clínico pode ser uma forma de oferecer a essas pessoas uma melhor qualidade de vida, aliviando os sintomas da doença e diminuindo o efeito de doenças secundárias, causadas pelo tratamento convencional. Para Lyon e colaboradores⁹⁷, a fotoquimioterapia é um tratamento antifúngico alternativo que pode alcançar um desempenho mais eficaz com menos desconforto ao paciente.

Do mesmo modo que nos demais micro-organismos, a fotoquimioterapia se utiliza da luz em um comprimento de onda específico para ativar um fotossensibilizador não tóxico na presença de oxigênio, a fim de irradiar a célula-alvo⁵¹. A metodologia empregada varia, pois a fotoquimioterapia depende, dentre outros fatores, do tipo da célula, tipo de *laser*, da área irradiada e, principalmente, do fotossensibilizador. A classe frequentemente empregada de fotossensibilizadores é o azul, corantes conhecidos como sais fenotiazínicos, incluindo o azul de toluidina, azul de metileno e corantes azuis¹¹⁶. O tratamento tem como mecanismo de ação a inibição da 14 α -dimetilose, que está presente no citocromo P-450 da célula fúngica. Normalmente, estudos têm atribuído à utilização de uma fonte de *laser* em torno de λ 630 nm⁷⁸.

Diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de verificar a eficiência desse tipo de tratamento em diferentes micro-organismos, uma vez que os micro-organismos continuam sendo a maior causa de infecções em feridas cirúrgicas, irritações de pele, dentre outros problemas, e os regimes profiláticos estão cada vez mais difíceis por causa do surgimento de espécies resistentes. De acordo com Prates e colegas¹⁴³, a incidência de micoses invasivas tem aumentado significativamente ao longo das últimas três décadas, e agora representa uma ameaça crescente para a saúde humana devido a uma combinação de difícil diagnóstico e uma escassez de drogas antifúngicas eficazes ao tratamento.

Lee e colegas⁸⁹ empregaram MAL-fotoquimioterapia (metílico 5-amino-levulinico ácido) para tratar pacientes com *Malassezia folliculitis*. Três de seis pacientes conseguiram uma forte melhora nas lesões após três sessões de TFD e um paciente apresentou uma melhora moderada.

A utilização da fotoquimioterapia em tratamentos odontológicos tem se destacado em doenças periodontais⁷⁸. Um dos grandes desafios encontrados nos tratamentos dessas doenças é que geralmente não se consegue a remoção completa dos antibióticos utilizados, por isso é possível que o micro-organismo crie resistência ao medicamento.

Esse desafio encontrado na terapia convencional pode ser solucionado com a fotoquimioterapia, uma vez que esta torna o tratamento mais eficaz, pois a radiação da luz consegue atingir locais de difícil acesso para o tratamento convencional. Desse modo, um dos benefícios dessa técnica é que ela não é prejudicada pela resistência dos micro-organismos; sendo assim, a utilização da fotoquimioterapia pode diminuir a necessidade de antibióticos. De acordo com Lyon e seus colaboradores⁹⁷, a fotoquimioterapia tem sido utilizada com sucesso no tratamento de doenças infecciosas, incluindo infecções fúngicas.

Ainda que os estudos apontem a eficiência da fotoquimioterapia no tratamento de diversas doenças, esta eficiência está sempre relacionada com as concentrações de fotossensibilizador e com a irradiação. Esse fato pode ser

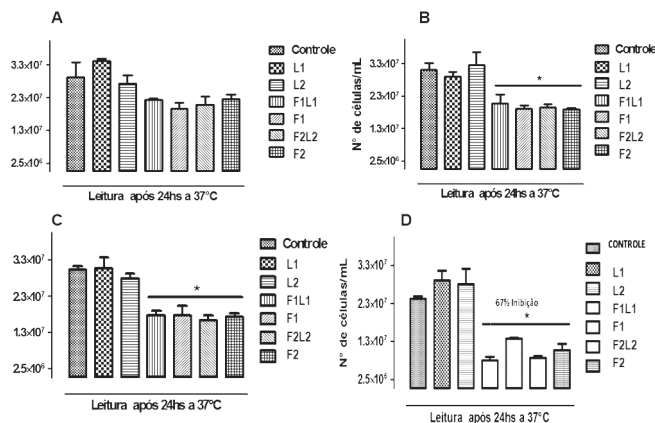


Figura 23.5 Resultados obtidos em experimentos utilizando *Cândida sp.* (A) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (50 µg/mL) e luz *laser* L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 5 minutos. (B) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (50 µg/mL) e luz *laser* L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 10 minutos. (C) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (100 µg/mL) e luz *laser* L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 5 minutos. (D) Avaliação do crescimento celular utilizando fenotiazina (100 µg/mL) e luz *laser* L1 e L2 (4,8 J/cm² e 12 J/cm², respectivamente), no tempo de pré-irradiação de 10 minutos.

observado no estudo de Mang e seus colaboradores¹⁰⁰, no qual a eficácia da fotoquimioterapia depende da proporção de concentração de corante utilizado para uma quantidade de células fúngicas. Os autores descrevem que para uma elevada densidade de *C. albicans*, uma alta concentração de

fotossensibilizador e, provavelmente, uma dose de luz elevada seriam necessários para obter uma fotoquimioterapia eficiente.

Sendo assim, é possível verificar que tanto a diversidade de micro-organismos como a diversidade de patologias e característica das áreas de atuação dificultam a definição de uma metodologia padrão que possa ser aplicada a cada tipo de infecção.

Outra grande área de utilização da fotoquimioterapia são as infecções fúngicas superficiais de pele. O estudo realizado por Dai e colegas³⁴ testou a eficácia da fotoquimioterapia usando uma combinação de corante azul (sal de fenotiazínico) e luz vermelha para a profilaxia e tratamento de *C. albicans* em infecção na pele de rato com feridas de abrasão. Esse estudo demonstrou que a TFD, com a combinação de corante azul e luz vermelha, pode reduzir significativamente a carga fúngica das feridas infectadas com *C. albicans*.

O tratamento de dermatose em pacientes utilizando aminolevulinato de metilo e irradiação de luz vermelha com comprimento de onda de λ 630 nm demonstrou que a fotoquimioterapia é eficiente para o tratamento de pacientes com pequenos números de lesões⁵⁰.

Alguns experimentos realizados por nossa equipe têm mostrado resultados significativos no tocante ao efeito da técnica em fungos (Figura 23.5).

23.7.3 Fotoquimioterapia em vírus

O aparecimento de verrugas intra-anais é comum em infecções causadas pelo papiloma vírus (HPV). A irradiação com um *laser* de comprimento de onda de λ 635 nm após o uso do *laser* de CO₂ diminuiu a quantidade de etapas e o tempo para o tratamento dessas verrugas em pacientes soropositivos¹⁵⁵. Já o azul de metileno e o *laser* vermelho foram eficientes para eliminar os vírus da herpes HSV-1 e HSV-2 sem atingir o núcleo das células dos pacientes. Além disso, esse uso combinado reduziu o retorno das lesões¹⁴⁰.

23.7.4 Fotoquimioterapia em protozoários

Peloi e colaboradores¹²² realizaram experimentos em ratos após indução da *Leishmania amazonenses*. O tratamento com azul de metileno e irradiação de diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda de λ 665 nm

e densidade de energia 5 mW/cm^2 , durante um certo intervalo de tempo, se mostrou eficaz para a leishmaniose tegumentar americana.

Os fotossensibilizadores do grupo da benzofenoxazina hidrofílica catiônica, quando comparados com os similares hidrofóbicos aniônicos, têm um melhor resultado na terapia fotodinâmica devido ao fato de que a membrana do parasita tem carga negativa. A benzofenotiazina demonstrou ter uma melhor ação na leishmaniose cutânea, enquanto PpIX, uma molécula porfirinoide, teve uma ação menor³.

No caso da malária, experimentos *in vivo* demonstraram que o *laser* pulsado NIR com densidade de energia de 485 mW/cm^2 pode ser utilizado para matar *Plasmodium falciparum* em culturas de células de glóbulos vermelhos⁶⁹. Através desse artigo, pode-se concluir que a terapia fotodinâmica tem sido relatada com uma maior frequência em bactérias, principalmente em *S. aureus*, *S. mutans* e *S. sanguinis*, e os *lasers* utilizados são os mais diversos, como de diodo, Nd: YAG, HeNe, entre outros.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com vírus, ainda existem poucas pesquisas nessa área. A aplicação do *laser* ou do LED é uma excelente alternativa para o tratamento de doenças virais, tendo em vista que o uso de medicamentos é dificultado pela constante taxa de mutações sofridas por eles.

Apesar dos estudos já descritos na literatura indicarem a eficiência da utilização da terapia fotodinâmica no tratamento de diversas patologias, o uso dessa fotoquimioterapia aplicada a micro-organismos requer mais estudos *in vitro* e *in vivo* para elucidação dos mecanismos de ação, dos efeitos, dos benefícios e das possíveis complicações, para que possa ser administrada a humanos com uma maior segurança e qualidade.

Um fotossensibilizador é uma molécula que age como um pró-fármaco, podendo ser natural ou sintética, inerte (não tóxica), e, na presença da luz, em um comprimento de onda específico, absorver essa energia luminosa e ser fotoativada. Esse precursor, chamado de fotossensibilizador, sofre excitação enquanto está sendo irradiado, passando a ser uma molécula farmacologicamente ativa. Após sua ativação pela luz, os fotossensibilizadores desencadeiam reações químicas que produzem diretamente ou indiretamente espécies citotóxicas, como radicais livres e oxigênio singlete⁸⁵.

Os fenotiazínicos são moléculas com potencial fotossensibilizante e grande propensão à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). São considerados hidrofílicos tricíclicos contendo nitrogênio e enxofre, e são conhecidos há mais de cem anos. Até agora mais de 5 mil derivados fenotiazínicos já foram obtidos, e essa classe vem se destacando por sua variedade

de propriedades químicas e biológicas. As fenotiazinas possuem um custo relativamente baixo, são facilmente encontradas e são bem toleradas. Estes compostos exibem atividade promissora contra bactérias, fungos, câncer, vírus, inflamações e protozoários, além de apresentarem propriedades anti-convulsivantes, analgésicas e imunossupressoras^{151,12}.

Durante o período inicial de pesquisa da terapia fotodinâmica moderna, os fenotiazínicos têm sido um padrão de fotossensibilizador bioativo, dando um rendimento razoável de oxigênio singleto (forma do oxigênio mais reativo e oxidante que o oxigênio molecular) e absorvendo luz na janela terapêutica (definida pela faixa de frequência na qual a laserterapia é mais efetiva) para terapia fotodinâmica (de λ 600 nm a λ 900 nm), sendo, assim, um ponto inicial de síntese de novas moléculas¹⁵².

O azul de metileno (MB) e o azul de toluidina (AT) (Tabela 23.1) são fotossensibilizantes fenotiazínicos aceitos na prática médica e de eficácia demonstrada em estudos na literatura. Possuem capacidade fotoantimicrobiana contra diferentes organismos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Apresentam estrutura química e propriedades físico-químicas semelhantes. Embora suas propriedades sejam semelhantes, a eficiência fotodinâmica desses compostos varia segundo os diversos micro-organismos³¹.

O corante fenotiazínico AT é um corante aromático heterocíclico solúvel em água ou em álcool, que absorve intensamente na região espectroscópica do ultravioleta visível. É um agente fotossensibilizante muito eficaz na inativação de micro-organismos como bactérias e vírus¹⁵¹. O AT é uma fenotiazina análoga ao MB, com mínimas divergências estruturais, que seriam a presença de dois metilaminas no azul de metileno. Tem sido amplamente empregado na coloração biológica, especialmente na hematologia¹⁵².

Tabela 23.1 Derivados fenotiazínicos avaliados como potenciais fotossensibilizadores contra tripanossomatídeos

SIGLA	NOME QUÍMICO	PM (G/MOL)	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
MB	3,7-bis(Dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride	319,85	$C_{16}H_{18}N_3Cl$	
TBO	(7-amino-8-methylphenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium chloride	305,83	$C_{15}H_{16}ClN_3S$	

Ao mesmo tempo, a indústria farmacêutica tem empreendido esforços vigorosos no desenvolvimento de medicamentos para doenças causadas por tripanossomatídeos e, de fato, conseguiu surpreendentemente quando

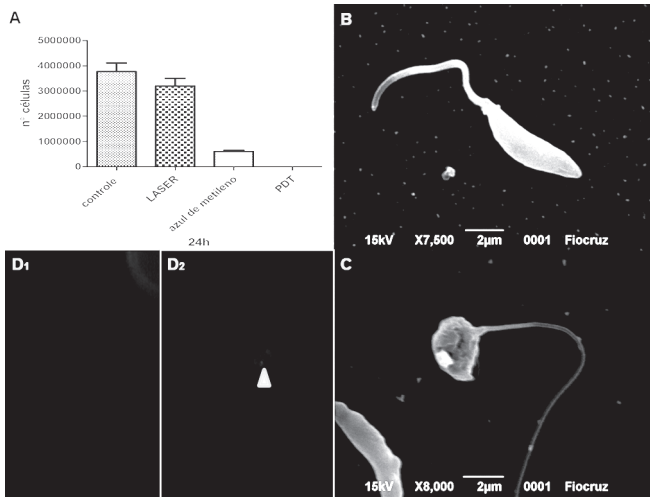


Figura 23.6 Resultados do protocolo utilizando leishmania: efeito da PACT sobre promastigotas. (A) Gráfico apresentando a inibição da proliferação celular. (B) Micrografia eletrônica de varredura de amostra controle, morfologia padrão de promastigota sem alterações morfológicas. (C) Micrografia eletrônica de varredura de promastigota tratada pela PACT, apresentando retração citoplasmáticas além de alterações microtubulares. (D1) Micrografia de fluorescência, utilizando MDC (sonda para detecção de autofagia), de promastigotas, controle apresentando ausência de autofagia. (D2) Micrografia de fluorescência, utilizando MDC (sonda para detecção de autofagia), de promastigotas tratadas pela PACT, apresentando marcação positiva para autofagia (seta azul).

considerou o seu conhecimento limitado às particularidades metabólicas dos parasitas. Pelos padrões terapêuticos modernos, no entanto, a maioria desses fármacos, se não todos, deve ser classificada como insatisfatória devido à sua grande toxicidade, eficácia limitada e desenvolvimento de resistência pronunciada^{27,154}. De fato, as várias formas de tripanossomíases e leishmanioses são comumente doenças negligenciadas, as quais matam cerca de 500 mil pessoas por ano. No fundo, esse cenário terapêutico frustrante tem cunho comercial, pois os altos custos atuais para o desenvolvimento desses novos fármacos não garantem um fácil retorno financeiro do investimento, visto que as doenças ocasionadas por tripanossomatídeos prevalecem em países com condições socioeconômicas desfavorecidas¹⁵⁴.

Nesse contexto, é considerando os impactos socioeconômicos mundiais, a importância para a saúde pública mundial e a necessidade de tratamentos mais eficazes e menos agressivos aos pacientes que este trabalho avaliará a opção de uso da fotoquimioterapia antiparasitária (QTFAp) como uma nova

forma de tratamento contra os tripanossomatídeos causadores da leishmaniose (Figura 23.6).

23.8 APLICABILIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ONCOLOGIA

O câncer é hoje um evidente problema de saúde pública mundial e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 espera-se uma incidência de 27 milhões de casos, com 17 milhões de mortes. No Brasil, as estimativas de 2012 e 2013 apontam para uma ocorrência de aproximadamente 518.510 de acometimentos, dentre os quais os tipos de câncer mais incidentes para o sexo masculino são os de pele (não melanoma), próstata, pulmão, cólon e reto e estômago. Para o sexo feminino, os mais comuns são os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide.

Nas últimas décadas, o progresso na pesquisa básica gerou uma melhor compreensão com relação à fisiopatologia dos tumores, levando inclusive ao desenvolvimento de novas drogas. Grandes ensaios clínicos foram realizados, e avanços, alcançados; porém, melhorias pouco significativas na terapia e muitas restrições a novos fármacos devido à toxicidade acarretam um baixo índice de novas drogas clinicamente aprovadas e liberadas pelos órgãos de fiscalização. A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido desenvolvida na esperança de atender a essa necessidade, apresentando-se como uma alternativa inovadora por ser minimamente invasiva, e, ao contrário do que acontece na quimio e na radioterapia, por ser menos demorada e causar menos efeitos adversos aos pacientes, o que torna possível sua aplicação ambulatorial^{2,128}.

A terapia fotodinâmica (TFD) utiliza um agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular para matar seletivamente certos tipos de células. Na dermatologia e na odontologia, utiliza-se o TFD com sucesso no tratamento de câncer de pele não melanoma e lesões pré-malignas e câncer bucal, e uma das grandes vantagens é a possibilidade de administração tópica, permitindo a destruição do tecido canceroso e poupando o tecido periférico normal^{58,73,87,119,131,142}. Entretanto ainda não existe um protocolo definido quanto ao número de sessões e intervalo entre elas^{58,73}.

Um estudo para analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais de células neoplásicas Hep-2 submetidas à TFD utilizou o zinco ftalocianina como corante. As células neoplásicas Hep-2 submetidas à TFD mostraram-se

fotodanificadas morfológica e ultraestruturalmente, sendo possível observar algumas alterações nas organelas celulares. Portanto, pode-se concluir que após TFD utilizando ZnPc essas células sofreram morte por apoptose⁷⁹.

Há muitos trabalhos mostrando a aplicabilidade dos *lasers* de baixa potência e dos diodos emissores de luz (LED) em diversas áreas, seja na biotecnologia, nos processos biológicos ou nas inúmeras áreas da saúde, sendo os dois (*laser* e LED) muito similares no que diz respeito à eficácia do tratamento por fototerapia. No entanto, percebe-se que ainda não existe um consenso geral quanto ao protocolo exato a ser utilizado, tais como a quantidade, potência e tempo de aplicação. Espera-se que em um futuro próximo esses problemas acabem pelo contínuo avanço nos estudos e pesquisas, utilizando as diversas formas de luz.

A TFD é definida como uma terapia por reação fotoquímica direcionada a um controle localizado de um tecido doente, com o objetivo de causar destruição seletiva dessa região. É uma técnica terapêutica composta de duas etapas, na qual inicialmente utiliza-se uma droga sensibilizante (fotossensibilizador), seguida pela etapa de irradiação de uma luz visível e ativação desses compostos. Os fotossensibilizadores quando ativados transferem então a energia fornecida ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzindo a morte celular. A afinidade do fotossensibilizador pelas células tumorais permite um alto direcionamento ao local afetado, possibilitando um tratamento localizado, uma vez que o tempo de meia-vida das ROS é muito curto e não permite a difusão desses compostos a outras regiões do tecido^{2,128}.

Apesar da utilização da luz solar pelos povos antigos no tratamento de diversas condições, como vitiligo e psoríase, estudos da utilização da luz como modalidade terapêutica propriamente dita só começaram a se desenvolver no início do século XX. Os primeiros experimentos sobre o assunto foram descritos por Oscar Raab em 1900 e consistiam na descrição do efeito fotodinâmico da laranja de acridina em protozoários e paramécio, na presença de luz solar. Tal observação levou ao desenvolvimento de compostos derivados da hematoporfirina que posteriormente foram utilizados como marcador fluorescente para o diagnóstico do câncer¹²⁸.

Porém, só em 1972, a partir das pesquisas de Diamond et al., mostrou-se a possibilidade de os fotossensibilizadores serem utilizados em aplicações terapêuticas, após a verificação da eficácia da TFD no tratamento de gliomas de ratinhos¹²⁸. Atualmente, os estudos com essa modalidade intensificaram-se, mostrando as potencialidades terapêuticas da TFD no tratamento

de câncer de cabeça e pescoço, cérebro, pulmão, pâncreas, cavidade intraperitoneal, mama, próstata e pele².

Apesar dos resultados promissores, só em 1993 se deu a aprovação do primeiro fotossensibilizador, ocorrida no Canadá. Tratava-se do Photofrin® (um derivado da hematoporfirina), para o tratamento do câncer da bexiga. Mais tarde, este foi aprovado pela agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do câncer esofágico. Hoje, existem já alguns fotossensibilizadores aprovados em vários países para aplicações em TFD¹²⁸.

Evidencia-se, portanto, a necessidade de mais estudos para estabelecer o valor da TFD em comparação com os tratamentos convencionais em termos de eficácia, tempo de recuperação, complicações, aceitabilidade do paciente e custos². Ainda assim, nos últimos anos, a terapia tem ganhado espaço, tendo sido indicada e utilizada principalmente na dermatologia, para o tratamento de câncer de pele, progredindo de um recurso terapêutico experimental para a primeira opção no tratamento de lesões como queratoses actínicas e outras lesões superficiais como carcinoma basocelular superficial e doença de Bowen⁵⁸. Tendo em vista que a terapia fotodinâmica apresenta como características uma baixa toxicidade ao tecido normal, efeitos sistêmicos mínimos, morbidade em longo prazo bastante reduzida e falta de mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida, essa poderá se tornar uma opção terapêutica valiosa para o tratamento do câncer, ou ainda ser combinada a outros tratamentos contra o câncer².

23.8.1 Os efeitos biológicos da terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica está baseada no princípio de que a ativação de um fotossensibilizador pela luz visível cria espécies de oxigênio citotóxicos e radicais livres, que destroem seletivamente as células de proliferação rápida como o câncer²². Para realizar a TFD são necessários três elementos: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio. Basicamente, essa técnica consiste em duas etapas: primeiro o agente fotossensibilizante acumula-se nas células tumorais após a administração tópica ou sistêmica. Em seguida, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda específico para o espectro de absorção do agente fotossensibilizante (ativação do fotossensibilizador)¹⁴².

A TFD baseia-se em reações fotooxidativas, nas quais o fotossensibilizador, após ser excitado pela luz, passa do seu estado fundamental (S_0) para

seu primeiro estado excitado (S_1), de meia-vida curta. Nesse momento, as moléculas podem voltar ao estado de repouso, liberando energia em forma de fluorescência por meio da emissão de fótons ou prosseguir na cadeia de reações químicas, até alcançar o estado tripleto, de meia-vida mais longa. As moléculas no estado tripleto transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singleto (1O_2), altamente reativo, de meia-vida curta e responsável pela morte celular. O fotossensibilizador excitado (tripleto) pode reagir com moléculas do substrato biológico, formando radicais que reagem com o oxigênio gerando oxidação (reação do tipo I), ou transferir a energia diretamente ao oxigênio, gerando o oxigênio singleto (reação do tipo II). O oxigênio singleto reage com moléculas no interior da célula e nas membranas, causando o dano celular. A oxidação dos constituintes celulares pelos oxigênios reativos danificam as membranas plasmáticas e as organelas celulares, com subsequente alteração de permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. Alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem. Fotossensibilizadores que se localizam preferencialmente nas mitocôndrias levam a célula principalmente à apoptose, enquanto fotossensibilizadores que se localizam nos lisossomos ou nas membranas, em geral, promovem tanto a apoptose quanto a necrose^{14,58,142}.

A destruição direta das células tumorais deve-se aos danos fotodinâmicos de caráter irreversível provocados molecularmente em determinados alvos subcelulares. A natureza molecular dos alvos foto-oxidados influencia extensamente as vias de sinalização e os tipos de morte que são posteriormente desencadeados pela TFD¹²⁸. A TFD pode ativar três principais vias de morte celular: morte celular por apoptose, necrose e autofagia².

Acredita-se que as doses mais baixas de TFD levam a mais células apoptóticas, enquanto doses mais elevadas conduzem a proporcionalmente mais células necróticas. A meta mais importante da TFD em vias de sinalização celular é a ativação da via pró-apoptótica da família de proteínas Bcl. Os danos provocados pela luz em Bcl-2 induz a apoptose em células cancerosas. Outros estudos descobriram que proporções elevadas de morte celular após a TFD ocorrem quando há uma forte evidência de caspases 3 e 9 presentes no lisado celular, indicando que a TFD deve ativá-los dentro da via de morte celular. Tem sido sugerido que a apoptose e a necrose apresentam percursos de iniciação comum e que o resultado final é determinado pela presença de uma caspase ativa. Isto implica na inibição da apoptose e direciona as células a necrose, de modo que as células suficientemente danificadas pela TFD são destruídas, independentemente do mecanismo envolvido¹²⁰.

Estudos recentes mostraram que a TFD pode induzir autofagia, eventualmente, devido à alta reatividade das ROS produzidas. A autofagia é iniciada numa tentativa de remover as organelas lesadas ou para degradar agregados de proteínas, produzidas pelas reações fotodinâmicas, as quais não podem ser removidas pela ubiquitina. No entanto, como a autofagia é um processo autolimitado, é possível que a sua persistência induza um colapso metabólico e bioenergético suficiente para provocar a morte celular. A localização subcelular específica ou a organela celular onde ocorrem danos provocados pelas ROS são fatores que influenciam o resultado do processo autofágico¹²⁸.

A TFD mostrou causar dano oxidativo nas bases do DNA, rupturas dos filamentos e ligações cruzadas. O potencial mutagênico varia entre tipos de células, refletindo possivelmente diferenças nos mecanismos de vigilância, capacidade de reparação ou dano. Pode-se concluir que os efeitos prejudiciais para o DNA da TFD não são apenas dependentes das variáveis da TFD, mas dependem também dos mecanismos celulares de reparação¹²⁰.

Desde o início dos anos 1980 foi observado que um mecanismo adicional indireto coexiste com o efeito citotóxico da TFD: trata-se do efeito de obstrução vascular, o qual provoca morte por indução de isquemia. Posteriormente, vários estudos pré-clínicos demonstraram que os mecanismos relativos aos efeitos vasculares variam segundo os fotossensibilizadores e tecidos-alvo¹²⁸.

Estudos recentes demonstram que a TFD induz uma resposta imune no hospedeiro. Esta tanto pode ser imunoestimulatória quanto imunossupressiva. Uma resposta imunoestimulatória pode melhorar ainda mais os efeitos terapêuticos no tumor primário, assim como nas metástases. Apesar de a TFD ter a capacidade de estimular uma resposta imune antitumoral, esta nem sempre se verifica. A explicação para esse acontecimento pode ser a disfunção das células dendríticas causada pelo tumor, que leva a uma resposta imunossupressiva^{120,128}.

23.8.1.1 Fotossensibilizadores

Existem vários fotossensibilizadores que têm alcançado bons resultados no tratamento oncológico, porém apenas alguns estão disponíveis comercialmente, enquanto outros se encontram em nível de ensaios clínicos. Os fotossensibilizadores são fundamentais para a TFD, e, nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de um fotossensibilizador ideal.

As características ideais para um fotossensibilizador seriam ter alta seletividade e retenção para o tecido-alvo, capacidade para a formação de espécies citotóxicas, pureza e estabilidade química, absorver a luz em comprimentos mais longos (λ 600 nm a 850 nm) para maior penetração da luz nos tecidos, elevado rendimento quântico tripleto, de oxigênio singleto, devendo essas espécies reativas apresentarem um tempo de semivida relativamente elevado. Não deve apresentar toxicidade no escuro nem provocar efeitos mutagênicos e carcinogênicos, e deve possuir estrutura anfifílica para facilitar a biodistribuição nos tecidos, e ser facilmente eliminado pelo organismo¹²⁸.

A questão da seletividade dos fotossensibilizadores às células tumorais ainda não foi bem elucidada; porém, as hipóteses levantadas para explicar o acúmulo preferencial do fármaco nas células cancerosas são de que as características lipofílicas desses compostos apresentam alta afinidade aos receptores de LDL (*low density lipoprotein*), expressas em grande número nas células tumorais e essenciais ao seu rápido desenvolvimento. Porém, esse mecanismo ainda continua a ser debatido, pois existem fotossensibilizadores com alta afinidade para LDL, porém baixa seletividade tumoral, assim como há aqueles com baixa afinidade ao LDL, porém alta seletividade tumoral. Além disso, supõe-se que um grande espaço intersticial (maior quantidade de lipídeos, fibrina e colágeno) e especialmente uma grande vascularização tumoral associada a uma baixa drenagem linfática possam estar ligadas a esse acúmulo preferencial. Outro fator relevante seria o fato de que o aumento do processo glicolítico anaeróbico em tumores hipóxicos provoca acidose no fluido intersticial e aumento de cargas negativas na membrana dessas células, fomentando a retenção de compostos que se tornam mais protonados em condições ácidas¹⁰⁹.

Como dito anteriormente, o primeiro fotossensibilizador aprovado foi o Photofrin[®], seguido do desenvolvimento de vários outros, que hoje são divididos em três gerações: os de primeira geração, ou de tipo porfirínico; os de segunda geração, que incluem vários derivados de porfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e baterioclorinas; e os de terceira geração, que incluem fotossensibilizadores com maior solubilidade (menor lipofilicidade)¹²⁸.

Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados na prática clínica, notadamente o Photofrin[®], pode-se observar um baixo coeficiente de absorvidade, o que implica na administração de grandes quantidades do composto para que seja obtida uma resposta fototerapêutica eficiente. Apresentam também baixa penetração dos tecidos pela luz, porque seu máximo de absorção não passa dos λ 630 nm, e baixa velocidade de eliminação, causando

fotossensibilidade prolongada da pele mesmo após a finalização do tratamento¹⁰⁹. Devido a esses efeitos, vários trabalhos recentes têm focado no desenvolvimento de veículos para melhorar a seletividade desses fotossensibilizadores, de modo a aumentar a captação tumoral. Dentre os melhores candidatos, encontram-se as emulsões de lipossomas e nanopartículas. Porém, tem sido observado que esses veículos podem diminuir o rendimento quântico de oxigênio singleto, uma vez que o oxigênio singleto formado tem que se difundir para fora do sistema e, como o seu raio de ação é muito curto devido ao seu pequeno tempo de semivida, pode não conseguir alcançar o alvo e eliciar o efeito desejado. Uma alternativa a esse problema seria ligar esses sensibilizadores a anticorpos, favorecendo ao máximo a seletividade às células tumorais¹⁰⁹.

23.8.1.2 Aplicações da TFD na oncologia

Pele

Na dermatologia, a TFD é empregada no tratamento do câncer de pele não melanocítico (CPNM) e outras doenças inflamatórias e proliferativas não neoplásicas, como psoríase, doença de Darier, sarcoidose e necrobiose lipoídica. Nas últimas décadas, a TFD progrediu de um recurso terapêutico experimental para a primeira opção no tratamento de lesões como queratoses actínicas (QA) e outras lesões superficiais extensas como carcinoma basocelular superficial (CBC) e doença de Bowen (DB)^{139,142}. Na dermatologia, a TFD é realizada principalmente utilizando moléculas precursoras tópicas da via biossintética do heme, tal como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) ou o seu metil éster metil aminolevulinato (MAL). Na pele, essas moléculas são em seguida convertidas em porfirinas fotoativáveis, nomeadamente protoporfirina IX (PpIX)¹⁰. Segundo Braathen e colaboradores²¹, o dano celular e, conseqüentemente, a morte, são então induzidos mediante iluminação da pele com luz azul ou vermelha.

Câncer de pele não melanocítico

O câncer de pele não melanocítico é o tumor maligno cutâneo mais comum (70%) na idade adulta, e seu tratamento deve ser escolhido de

acordo com o tipo clínico, tamanho e localização da lesão. A TFD é uma modalidade terapêutica recente para tratamento do câncer de pele não mela-

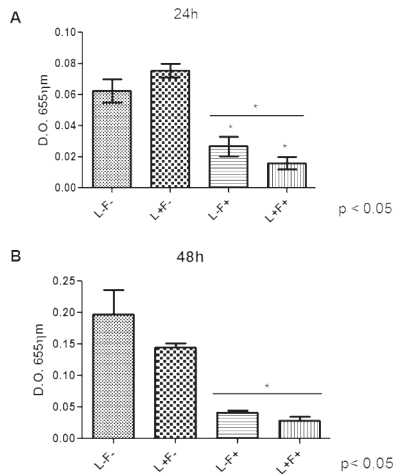


Figura 23.7 Resultados obtidos com o uso da TFD em células de melanoma. (A) Avaliação do crescimento celular em 24 horas. Em comparação ao grupo controle 24 horas, é possível observar a redução significativa nos grupos L-F+ e L+F+. (B) Avaliação do crescimento celular em 48 horas. Em comparação ao grupo controle 48 horas, é possível observar a redução significativa nos grupos L-F+ e L+F+.

nocítico e pode ser considerada a primeira escolha em alguns casos⁵⁸.

Souza e colaboradores¹⁷⁰ testaram o ALA-TFD em 20 pacientes com lesões basocelular, câncer não melanocítico com elevada incidência e doença de Bowen. Após 60 meses houve redução das lesões tumorais de 91,2% para 57,7%, demonstrando, portanto, a eficácia da ALA-TFD na redução das lesões. No entanto, os autores recomendam o uso da ALA-TFD em sessões repetidas para minimizar a recorrência das lesões.

Câncer de pele melanocítico ou melanoma

O melanoma cutâneo é uma lesão maligna que acomete os melanócitos, células produtoras de melanina, substância responsável pela coloração e defesa da pele contra a radiação ultravioleta. O tumor pode se desenvolver em qualquer área do corpo, tendo maior incidência nas áreas expostas à radiação solar, além das mucosas, globo ocular e leptomeninge¹²⁷.

Em seus estudos, Santos¹⁵⁷ analisou os efeitos do *laser* de baixa potência no crescimento celular e comportamento quimiotáxico em células de murinos com melanoma. Os resultados mostram que o *laser* de baixa potência com o comprimento de λ 660 nm, nos tempos de 48 horas e 72 horas, não promoveu mudanças no metabolismo celular; porém, houve alteração do comportamento quimiotáxico quando essas células foram irradiadas com um comprimento de onda mais alto.

Powell e colaboradores¹⁴² compararam os efeitos de diferentes doses de *laser* (λ 780 nm, λ 830 nm e λ 904 nm) em células de melanoma cultivadas em laboratório. Após as irradiações, as células não apresentaram alterações na taxa de proliferação nos diferentes tratamentos, resposta semelhante à obtida por Santos¹⁵⁷.

A Figura 23.7 mostra resultados obtidos com a técnica em células de melanoma.

Cabeça e pescoço

A incidência de câncer de cabeça e pescoço é elevada e tende a aumentar com a idade. Carcinoma de células escamosas é um dos carcinomas mais comuns em cabeça e pescoço. Os carcinomas de boca e orofaringe são classificados como o sexto câncer mais comum no mundo⁶⁰.

O tratamento básico para os vários tipos de câncer bucal consiste na eliminação dos tecidos neoplásicos através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma associação dessas três modalidades terapêuticas. A escolha da modalidade terapêutica depende da extensão, estadiamento tumoral, relação com estruturas anatômicas anexas, envolvimento de cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão⁷³. Em seus estudos, Karakullukcu e colegas⁷⁵ analisaram o uso da TFD em 170 pacientes com lesões de resultantes do câncer bucal. A taxa de resposta global dos pacientes foi de 90,7%, demonstrando que a TFD apresenta resultados favoráveis no tratamento de câncer bucal.

Papini e colegas¹¹⁹ estudaram a eficácia do ultrassom guiada por ablação a *laser* para tratamento não cirúrgico de metástases cervicais. Para tanto, os autores utilizaram a técnica de ultrassom guiada a *laser* em cinco pacientes e fizeram análises de tireoglobulina e alterações de linfonodos durante 12 meses. Ao final, houve redução dos linfonodos que estavam metastáticos, e em 60% dos pacientes não foi detectada a tireoglobulina. Portanto, a técnica de ultrassom guiada a *laser* de ablação pode ser utilizada no lugar de

cirurgias. No entanto, em longo prazo, estudos para controle da doença são necessários.

Pulmão

A atuação da TFD em neoplasias no pulmão foi um dos primeiros sucessos clínicos da técnica. Atualmente, após mais de trinta anos de experiência clínica e progresso técnico, parece claro que uma ampla variedade de lesões pulmonares malignas podem ser erradicadas ou reduzidas por TFD. Várias publicações revisadas demonstraram a eficácia da TFD para lesões endobrônquicas obstruindo, fase inicial, e endobrônquica minimamente invasiva tumores e, em particular, *in situ* e lesões de displasia. Tumores periféricos e pleurais também têm sido tratados com TFD através de intervenções assistidas por vídeo (VATS) ou colocação de cateteres guiada por CT⁴.

Endo e colegas⁴⁴ trataram 48 pacientes medicamente operáveis com câncer nos brônquios com comprimentos de tumor longitudinais menores ou iguais a 10 milímetros com TFD entre 1994 e 2006. Uma resposta completa foi alcançada em 94% dos pacientes, e as taxas de sobrevida global de cinco anos e de dez anos para a coorte foram de 81% e 71%, respectivamente.

Usuda e colegas¹⁸² utilizaram a TFD com o fotossensibilizador NPe6 no tratamento de câncer de pulmão. Os autores concluíram que a TFD com NPe6 produz morte tumoral eficaz em tumores grandes e profundos, invasivos, que foram reduzidos por eletrocautério. Caso contrário, as lesões não seriam normalmente passíveis de tratamento adequado com TFD.

Esôfago

Em seus estudos, Bronner e colegas²² avaliaram a ocorrência de proliferação de células escamosas em pacientes com displasia de alto grau no esôfago tratados com TFD. Ao final das análises histológicas, não foi detectada proliferação celular. Portanto, a TFD pode ser utilizada no tratamento de pacientes com displasia de alto grau.

Cérebro

A seletividade da absorção de fotossensibilizadores em tumores cerebrais malignos, chamados de gliomas, tem atraído ao longo dos últimos vinte anos mais interesse; porém, a evidência de que a adição de TFD após ressecção cirúrgica desses tumores pode melhorar significativamente a sobrevivência é limitada. No entanto, a administração do agente fotossensibilizante ALA, antes da cirurgia, para identificar as margens do tumor através da fluorescência é melhor do que dentro do tumor, pois internamente a fluorescência é menor. Isso faz com que a ressecção do tumor seja mais completa, mas, infelizmente, não tem mostrado aumentar o tempo de sobrevivência^{5,21,61}. Estudos *in vitro* demonstraram resultados promissores quando utilizaram o ALA como agente fotossensibilizador na dose entre 80 J/cm² e 100 J/cm² com λ 660 nm¹⁸².

A técnica preferencialmente sugerida é a realização da TFD através de um cateter com fibra óptica, sendo necessário administrar previamente um fotossensibilizador ao paciente e esperar tempo suficiente para o agente impregnar seletivamente as células tumorais. O cateter com a fibra é fixado no tecido cerebral cirurgicamente. A primeira dose de TFD é dada na sala de recuperação, sendo aplicada a dose de 100 J/cm² para a periferia da cavidade do tumor. Foi utilizado o *laser* de diodo, com um comprimento de onda de λ 630 nm. Mais doses de TFD podem ser dadas à beira do leito nos dias subsequentes. Essa técnica fora do centro cirúrgico proporciona um tratamento mais fracionado e com menos custos ao paciente que, segundo o estudo, o tratamento com cinco aplicações consecutivas mais a administração de dexametasona durante três dias para evitar o edema cerebral.

Bexiga

O carcinoma superficial de bexiga é geralmente tratado pela ressecção transuretral. No entanto, esse tratamento é marcado por uma taxa de recorrência de até 70%, razão pela qual é intensa a busca por uma modalidade de tratamento eficaz na erradicação confiável das células tumorais. A TFD tem sido estudada como tratamento alternativo para o câncer de bexiga, porém é mais indicada para o tratamento dos casos superficiais, pois alguns estudos mostraram que a utilização na mucosa da bexiga é contraindicada por causar contração. O fotossensibilizante Hexvix[®] tem se mostrado menos penetrante, não alcançando a mucosa e sendo muito promissor. O propósito da TFD no tratamento do câncer de bexiga é duplo: erradicação dos focos

visíveis e invisíveis e prevenção de recorrência após procedimento cirúrgico para remoção do tumor^{9,49,57}.

Próstata

O uso da terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer da próstata irá requerer que todo o tecido glandular, tanto o normal como o maligno, seja extirpado, para que se obtenha o sucesso. A introdução de um fotossensibilizador que atua apenas sobre a região vascular representa uma mudança no paradigma da TFD, pois a meta nesse caso não é matar as células tumorais diretamente, mas sim os seus vasos sanguíneos. Os fotossensibilizadores mais utilizados em estudos com câncer de próstata são os derivados da hematoporfirina^{114,115}.

O efeito citotóxico desta modalidade terapêutica é obtido quando a fonte de energia *laser* incidente, através de fibras ópticas orientadas por punção na região perineal, chega à próstata fotossensibilizada. Os efeitos colaterais são poucos e estão relacionados à punção local, causando hematúria e incontinência urinária^{15,144}.

Pâncreas

O carcinoma de células pancreáticas é o tipo mais comum de câncer de pâncreas. Alguns estudos demonstraram a viabilidade do mTHPC como fotossensibilizador, na dosagem de 0,15 mg/Kg, na TFD para câncer de pâncreas utilizando fibras de luz percutâneas. Estudos revelam que a TFD pode ser uma boa alternativa para tratamento, devido à necrose completa observada apenas com a dose mais elevada de luz, porém a rápida progressão do tumor dificulta maiores estudos. O uso da TFD para esse tipo de câncer provavelmente será bem-sucedido como terapia adjuvante¹⁵⁵.

Fotoquimioterapia antimicrobiana

A fotoquimioterapia, assim como a TFD, envolve a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, produzindo danos às células dos micro-organismos¹⁵¹. Primeiramente, a demonstração dos efeitos da TFD sobre micro-organismos foi realizada por Raab, em 1900, que publicou

um artigo no qual descrevia os efeitos fotodinâmicos no micro-organismo unicelular conhecido como *Paramecium caudatum* quando este era submetido ao corante acridina, juntamente com a luz, ocasionando a morte desse micro-organismo.

Bactérias gram-positivas e gram-negativas reagem diferentemente à TFD. Em bactérias gram-positivas, a porção externa da parede celular é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos a vinculação mais eficiente e a difusão para locais sensíveis da célula⁹⁹. As bactérias gram-negativas foram inicialmente consideradas resistentes à TFD, uma vez que fosfolipídeos, lipoproteínas e polissacarídeos complexos presentes na membrana externa de bactérias como *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *K.pneumonia* e *H.influenza* podem inibir a ligação das moléculas de FS aniônicos^{99,112}, a menos que estratégias adicionais sejam utilizadas de forma a facilitar o seu transporte através da membrana celular³⁷.

Dentre as estratégias que facilitam o transporte do FS através da membrana de bactérias gram-negativas destacam-se o uso de um FS não carregado (a exemplo da deuteroporfirina e da protoclorofila), de um FS carregado positivamente ou catiônico (a exemplo de azul de toluidina O, azul de metileno, substitutos de tetracatiônicos de porfirina, catiônicos ftalocianinas) ou o uso de um FS combinado com peptídeos da membrana¹¹³. O FS catiônico é o ideal contra células bacterianas, pois sua taxa de absorção em tais células é muito maior do que para as células de mamíferos⁶⁶.

Carvalho²³ avaliou *in vitro* o efeito antibacteriano do *laser* diodo (GaAlAs, λ 650 nm, 8 J/cm², 50 mW, ϕ = 0,1 cm², Laserline®), associado à substância fotossensível azul de toluidina, sobre as bactérias de úlceras cutâneas infectadas, e observou que houve redução significativa das unidades formadoras de colônias (UFC) quando submetidas à TFD.

Dobson e Wilson¹⁹¹ analisaram a redução bacteriana por fotoinativação de biofilme formado pelas espécies *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actynomycetecomitans*. Para isso, foi utilizada uma associação de diversos corantes e *laser* de HeNe de 7,3 mW de potência, sobre amostras de biofilme em placa de petri. Os autores observaram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias, e os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio e hematoporfirina éster não foram tão efetivos. Segundo os resultados, a técnica da terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana.

Burns e colaboradores¹⁹² verificaram a fotoinativação de bactérias cariogênicas associando o AIPc₂ ao *laser* diodo de GaAlAs. Foram

observadas reduções de aproximadamente 10^6 UFC para *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *A. viscosus*, não sendo encontrado efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias quando elas foram expostas somente à luz *laser* ou ao fotossensibilizador.

Soukos et al.¹⁶⁸ avaliaram os efeitos da TFD utilizando o *laser* de baixa intensidade vermelho associado ao corante azul de toluidina sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e cultura de *S. sanguis*. Segundo os resultados, os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de corante e do *laser* provocou a morte bacteriana, sem comprometer a viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos.

Tanaka et al.¹⁷¹ avaliaram os efeitos citotóxicos da TFD sobre os neutrófilos do sangue periférico de murinos utilizando diferentes fotossensibilizadores. Cada fotossensibilizador foi testado em uma concentração que exerceu um efeito máximo bactericida sobre *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Os autores observaram que a maioria dos neutrófilos foram mantidos viáveis (mais de 80%) após a TFD usando o azul de toluidina ou o azul de metileno, o que sugere que essa terapia pode preservar estas células, enquanto exerce um efeito terapêutico significativo sobre a infecção microbiana localizada.

Tecido ósseo

Guglielmi et al.⁵⁸ investigaram a utilização da TFD como um tratamento alternativo para osteomielite. Foi utilizada uma cepa de *S. aureus* para a indução da osteomielite, que ocorreu em dez dias. Após este período, o tratamento compreendeu a administração intraperitoneal de ácido aminolevulínico (300 mg/kg), e 4 horas após a realização deste procedimento, a área infectada foi irradiada com luz *laser* ($\lambda 635 \pm 10$ nm, 75 J/cm²), entregue via transcutânea por meio de uma fibra óptica colocada na tíbia. Os autores observaram que o ácido aminolevulínico foi eficaz na redução de biofilme no osso, confirmando, assim, seu potencial para o tratamento de osteomielite em modelo animal.

Goto et al.⁵⁷ avaliaram o efeito da TFD em modelo animal de osteomielite utilizando o fotossensibilizador Na-Pheophorbide (Na-Phde). O grupo controle foi tratado com injeção de solução salina tamponada com fosfato, enquanto no grupo experimental, 48 horas após a infecção inicial com *Staphylococcus aureus* na tíbia dos animais, foi injetada intraperitonealmente uma solução de Na-Phde (560 mmol/L). Sessenta minutos depois da

injeção desse fotossensibilizador, a área infectada foi irradiada com luz *laser* (λ 670 nm, 125 mW, 10 minutos, 93,8 J/mm²). O crescimento bacteriano e os exames histológico e radiológico foram avaliados 14 dias após o tratamento inicial. Os autores observaram que a TFD com Na-Phde preveniu significativamente o edema. Além disso, histológica e radiograficamente, foi observada inibição da destruição óssea na região da tíbia.

Tardivo e Baptista¹⁷² avaliaram o efeito de dois protocolos de TFD em osteomielite de pés diabéticos de dois pacientes. No primeiro paciente, a fim de combater a infecção nos tecidos ósseos e moles, uma solução de fenotiazina (uma mistura de 1:1 das soluções de azul de toluidina 2% e azul de metileno a 2%) foi introduzida na fístula, de forma a alcançar o osso subjacente. Em seguida, duas fontes luminosas foram utilizadas sobre as infecções dos tecidos supracitados, as quais deveriam ser tratadas ao mesmo tempo. Cinco minutos após a injeção do FS, a irradiação foi realizada (10 minutos) através da introdução de uma fibra óptica através da fístula, de forma a entregar a luz *laser* (HeNe, λ 632 nm, 5 mW) diretamente no osso, e a irradiação externa do hálux foi realizada com uma fonte de luz policromática não coerente (RL 50, λ 570 nm a 750 nm, 100 mW, 60 J/cm², Φ = 50 mm). O protocolo do segundo paciente foi semelhante ao do primeiro; entretanto, foi utilizada uma mistura 1:1 de hipérico (10% de propileno glicol e 2% de azul de metileno), sendo a irradiação interna (osso) realizada com luz branca não coerente (TransLux III; Kulzer, São Paulo, Brazil; 7 mW) e a externa com luz policromática não coerente, conforme o protocolo do primeiro paciente. De acordo com os autores, ambos os protocolos foram efetivos no manejo da osteomielite em pés diabéticos, sendo demonstrado por meio de radiografias áreas evidentes de reparo ósseo.

Tem sido estudado durante muitos anos que o osso normal é relativamente resistente a TFD, e muitos estudos estão na fase *in vitro* ou animal, de modo que não há nada concreto no tratamento de doentes humanos com câncer ósseo ou com metástase óssea. Alguns estudos relataram o aumento da sobrevida quando realizada a TFD em metástase óssea ou osteossarcoma, porém também relataram que para as metástases ósseas será importante estudar melhor a colocação de fibras na coluna vertebral^{35,42}.

Câncer de mama

Estudos com a TFD no câncer de mama mostraram que a seleção de pacientes para o uso da terapia se deu a partir de critérios como não

responder à quimioterapia ou à radioterapia, devido à grande extensão do local do tumor, ou ser ineleável para cirurgia. O carcinoma de mama recorrente sugere que a terapia fotodinâmica parece ser um valioso complemento aos tratamentos clássicos. Os riscos potenciais da terapia são baixos, não há influência sobre a qualidade de vida e não ocorre promoção de metástases^{114,115}.

Em estudos realizados por Montazerabadi^{105,106}, foi demonstrada a eficácia do mitoxantrona, um agente antineoplásico, como fotossensibilizante na terapia fotodinâmica em uma linhagem celular de tumor de mama em humanos (MCF-7). Esse estudo comparou diferentes concentrações de mitoxantrona com diferentes doses de luz. Conclui-se que numa concentração relativamente baixa do antineoplásico, 5 μM , associada com 30 J/cm^2 de luz no comprimento de onda de λ 660 nm, ocorreu a morte significativa das células tumores MCF-7, mostrando o potencial desse antineoplásico como fotossensibilizador na TFD nos tumores de mama. Porém, muitos estudos ainda estão em andamento.

Condições pré-malignas da genitália e regiões pélvicas

A neoplasia intraepitelial (alterações pré-cancerosas que podem evoluir para cancro invasivo) da vulva, vagina, colo do útero, do pênis e da região perianal está muitas vezes relacionada com a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV). Muitas vezes ocorre o desenvolvimento de áreas sensíveis e lesões doloridas e desconfortáveis, tendo um grande potencial para a TFD⁹⁰.

O estudo realizado por Trushina¹⁸⁰ teve como objetivo avaliar a eficácia da TFD no colo do útero, utilizando o fotossensibilizador Photogem[®] em pacientes com lesões pré-cancerosas e câncer cervical não invasivo. O Photogem[®] foi administrado por via intravenosa 48 horas antes da irradiação do tumor a uma dose de 2,5 mg/kg a 3,0 mg/kg, densidade de energia da irradiação *laser* de 150-200 J/cm^2 e densidade de potência de 150 mW/cm^2 a 250 mW/cm^2 . A irradiação foi realizada através da utilização de uma fibra óptica com iluminação direta em uma das extremidades; posteriormente, a complementação foi realizada através da utilização de uma fibra cilíndrica difusora. No retorno após 40 dias da TFD, as pacientes estavam sem lesões de vulva, vagina ou colo de útero (colposcopia alargada), não havia cicatriz e a elasticidade da vagina estava totalmente preservada. A TFD se mostrou eficaz para esse tipo de aplicação, principalmente se os históricos

clínicos das pacientes forem de ciclos de tratamento químico sem resultados satisfatórios.

Um dos avanços recentes da prática clínica com essa terapia é o desenvolvimento de *lasers* de diodo, equipamentos que se encontram altamente disponíveis e compatíveis para os fotossensibilizadores atualmente utilizados, tornando o procedimento ainda mais simples e barato. Esses *lasers* apresentam excelentes vantagens, pois são pequenos, podem ser facilmente transportados, são bastante fiáveis e não requerem um sistema de refrigeração externo. A TFD não é indicada no caso de tumores grandes, profundos ou disseminados, porque a penetrabilidade da luz monocromática utilizada até então não é capaz de penetrar além de 1 cm no tecido^{128,145}.

Muitos estudos estão sendo realizados em diversas especialidades oncológicas, porém os cânceres de pele, de cérebro e condições pré-malignas da genitália e regiões pélvicas apresentam estudos mais avançados com relação ao uso da TFD, principalmente como terapia adjuvante. As maiores dificuldades que os pesquisadores relatam é na determinação da dosagem e na escolha do fotossensibilizador, dois fatores que são cruciais ao sucesso terapêutico. O câncer de pele apresenta maiores pesquisas e melhores resultados pela sua facilidade de aplicação do fotossensibilizador e da irradiação do *laser*; já para cânceres de cérebro e de próstata, por exemplo, há a necessidade de utilização de fibras óticas para que a luz chegue à região fotossensibilizada, podendo este ser um empecilho na rotina hospitalar^{114,115}. Os efeitos colaterais são poucos e estão relacionados à região aplicada, no caso da próstata, por exemplo, causando hematúria e incontinência urinária, porém rapidamente resolvidos^{15,144}. Os riscos potenciais da terapia são baixos, não há influência sobre a qualidade de vida e não ocorre promoção de metástases. A TFD se mostrou eficaz para esse tipo de aplicação, principalmente se os históricos clínicos dos pacientes forem de ciclos de tratamento químico sem resultados satisfatórios^{97,125}.

No Brasil, assim como em países como Canadá, Alemanha, Estados Unidos, França e Japão, já existem protocolos clínicos para tratamento dos mais diversos tipos de tumores, porém a terapia ainda é pouco empregada na prática clínica¹³². Os estudos aqui demonstrados têm mostrado que a TFD pode ser considerada uma opção interessante no tratamento de lesões de pele pré-malignas não melanoma e para o tratamento de esôfago de Barrett e colangiocarcinoma irressecável. Já com relação à TFD em outros tumores, ainda restam desconfianças por parte dos clínicos quanto ao tratamento, uma vez que a análise da eficácia depende muito da observação, em vez de poder ser constatada por estudos devidamente controlados e randomizados,

com uma padronização unificada. Por essa razão, a terapia é oferecida apenas em um pequeno número de centros especializados^{128,145}.

Poucos esforços têm sido empreendidos no nosso país no sentido de estimular a pesquisa e o desenvolvimento nessa modalidade terapêutica, assim como, conseqüentemente, sua aplicação, embora se deva reconhecer que esse é um tema de pesquisa de grande interesse estratégico.

Podemos observar que as potencialidades da TFD no tratamento do câncer são imensuráveis, porém, o maior desafio em curto prazo é realizar ensaios clínicos para que fiquem cada vez mais claros os benefícios que essa terapia pode trazer. Como a medicina atual está baseada em evidências, é preciso apresentar estudos que convençam os profissionais de saúde e tragam informações relevantes sobre a eficácia, segurança, e papel significativo que essa terapia pode desempenhar nas condições tumorais, seja como co-terapia ou mesmo substituindo a convencional. Infelizmente, ensaios clínicos requerem tempo e dinheiro, embora já existam fotossensibilizadores disponíveis para esses ensaios e sistemas de emissão de luz de fácil acesso e baixo custo. Apesar dessa dificuldade, essa modalidade terapêutica tem encontrado caminho nas mais diversas áreas da medicina, sendo hoje a terapia de escolha em câncer de pele (não melanoma), encontrando-se em expansão. Outro foco das pesquisas tem se voltado para o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais específicos, veículos e tecnologias de entrega da luz, favorecendo ainda mais a seletividade e potencialidade dessa terapia, para que então essa técnica possa ser expandida e aplicada aos mais diversos tipos de câncer.

23.9 CONCLUSÕES

A tecnologia que se serve de diversos tipos de luz encontra-se atualmente em praticamente todas as áreas de pesquisa científica e tecnológica. Inicialmente, o maior número de aplicações do *laser* efetivou-se na ciência de materiais (deposição de filmes finos). Através de modificações como a duração dos pulsos, novos comprimentos de onda e diversos tipos de *lasers*, estes se popularizaram em outras áreas, como a biologia, a medicina e a biotecnologia.

Na área biológica, por exemplo, o *laser* pode ser utilizado na contagem e identificação de células hematológicas pelo seu tamanho e complexidade (hemograma); ou na identificação imunofenotípica por citometria de fluxo; quantificação de sequências de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real; tomografia celular, microdissecção de amostras,

localização de moléculas e células, bem como quantificação de compostos e biofilmes celulares por microscopia confocal.

Na medicina, o *laser* encontra várias aplicações. Os cirurgiões valem-se do feixe fino de luz que se concentra em quantidades significativas de energia em uma pequena região como bisturi nas cirurgias, uso em que o *laser* mostra eficiência associada ao fato de evitar contaminação por micro-organismos e sangramento das porções seccionadas. Usando o *laser*, os oftalmologistas tratam o afrouxamento da retina, uma causa frequente de cegueira. Outra fototerapia é o tratamento clínico que emprega a combinação de luz, oxigênio e um composto fotossensibilizador (FTS): a terapia fotodinâmica (TFD), usada no tratamento de uma variedade de patologias de caráter oncológico, cardiovascular, dermatológico, oftálmico ou microbiológico.

Na biotecnologia, as fototerapias auxiliam vários processos, sendo a espectroscopia Raman uma importante ferramenta analítica e de pesquisa cujas aplicações incluem o monitoramento da produção de carotenoides a partir da levedura *Phaffia rhodozyma*; determinação de concentrações de glicose, de acetato, de lactato e fenilalanina em biorreatores de crescimento de *E. coli*; e na determinação da concentração de nitrito e nitrato no monitoramento de bioprocessos em reatores para tratamento de águas residuais.

Como forma de alavancar as atividades industriais, e não só, foi possível uma rápida diferenciação de colônias de bactérias na base de padrões de difração da luz *laser* e análise da imagem. Já foi descrito um método óptico biotecnológico que transforma a energia da luz *laser* em calor para controlar a expressão de uma variedade de genes. Na indústria cervejeira, a tecnologia *laser* é usada na detecção dos micro-organismos deteriorantes da cerveja. Por sua vez, a aplicação da luz emitida por diodo (LED) tem sido utilizada para aumentar o rendimento de bioprocessos. Nesse caso, a utilização de determinados comprimentos de onda na faixa do espectro vermelho e de outra do infravermelho melhora a permeabilidade da membrana celular da levedura, favorecendo as trocas metabólicas, acelerando o consumo do açúcar e aumentando a produção de etanol. Outrossim, a aplicação de LED também permite monitorar em tempo real o consumo de substratos e a sua transformação em etanol, o que extrapola o uso dessa forma de energia para outras aplicações industriais.

Na fototerapia utiliza-se uma luz emitida por diodo (LED) ou a amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (*laser*). Sendo formas de emissão luminosa, o *laser* e o LED estão englobados dentro do espectro eletromagnético, ocupando as faixas destinadas à luz visível e luz infravermelha.

O LED não emite luz monocromática, coerente ou colimada, mas consiste de uma banda espectral relativamente estreita e é produzida pelas interações energéticas do elétron. As vantagens da utilização do LED são a eficiência similar no tratamento de diversas patologias de pele, cicatrização de feridas e reparo tecidual, além da longa durabilidade, baixo custo, não geração de calor, alta eficiência energética e dimensões reduzidas.

A fototerapia *laser* é uma modalidade de tratamento não invasiva, que vem sendo amplamente utilizada no controle das mais diversas afecções. Suas características peculiares e que lhe conferem maior aplicabilidade são o fato de ser coerente, monocromática e altamente colimada. Dentre os efeitos terapêuticos encontram-se o anti-inflamatório, analgésico e modulador da atividade celular, os quais têm sido comprovados em diversos estudos.

23.10 PERSPECTIVAS FUTURAS

As aplicações de fontes luminosas, em particular *lasers* e LEDs, possuem um potencial enorme na área da biotecnologia. Como demonstrado ao longo deste capítulo, as fontes de luz estão sendo estudadas em diversas áreas da saúde e biológicas, quer como agentes terapêuticos quer como métodos de diagnóstico. Vislumbramos algumas possíveis aplicações futuras que poderão ser inestimáveis para a biotecnologia. Dentre estas, destacam-se: o monitoramento ambiental; o monitoramento espectral de micro-organismos, insetos, e pestes agrícolas; avaliação da maturação de frutas, verduras e legumes; o diagnóstico espectral de doenças; e na área de exploração de petróleo e na recuperação de poços maduros.

REFERÊNCIAS

1. Aciole JMS, Castro ICV, Soares LGP, Barbosa AF, Aciole GT, Silveira L Jr., Pinheiro AL. Assessment of the LED phototherapy on femoral bone defects of ovariectomized rats: a Raman spectral study. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(3):1269-77.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel K, Foster T, Girotti A, Gollnick S, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61(4):250-81.
3. Akilov O, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte T, et al. The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against Leishmania Parasites. *Chemistry & Biology.* 2006;13(8):839-47.
4. Allison R, Moghissi K, Downie G, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* 2011;8(3):231-9.
5. Ampil F, Caldito G, Milligan S, Mills G, Nanda A. The elderly with synchronous non-small cell lung cancer and solitary brain metastasis: Does palliative thoracic radiotherapy have a useful role? *Lung Cancer.* 2007;57(1):60-5.
6. Arruda E, Rodrigues N, Taciro C, Parizotto N. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Revista Brasileira de Fisioterapia.* 2007;11(4):283-8.
7. Rasouli Ghahroudi AA, Rohn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, Fekrazad R. Effect of low-level *laser* therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2013.
8. Assis TO, Soares MS, Victor MM. O uso do *laser* na reabilitação das desordens temporomandibulares. *Fisioterapia em Movimento.* 2012;25(2):453-9.
9. Aysan N, Topaloglu N, Yuksel S, Gulsoy M. Biostimulative effect of 809-nm diode *laser* and indocyanine green on *p. aeruginosa* instead of photodynamic therapy. *Proc. SPIE 8569, Mechanisms for Low-Light Therapy VIII, 85690D (March 5, 2013).*
10. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photochem Photobiol Photomed.* 2010;26(3):118-32.
11. Bader M, Stepp H, Beyer W, Pongratz T, Sroka R, Kriegmair M, et al. Photodynamic therapy of bladder cancer – a phase I Study Using Hexaminolevulinat (HAL). *Urol Oncol.* 2013;31(7):1178-83.
12. Baldan C, Marques A, Schiavinato A, Casarotto R. The effects of different doses of 670 nm diode *laser* on skin flap survival in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2012;27(2):155-6.
13. Barbosa A, Soares L, Aciole J, Aciole G, Pitta I, Galdino S, et al. Evaluation of Photodynamic Antimicrobial Therapy (PACT) against Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: In Vitro Study. *AIP Conf. Proc.* 2011;1364(1):55.

14. Barbosa A, Sangiorgi B, Galdino S, Barral-Netto M, Pitta I, Pinheiro A. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2012;44(10):850-5.
15. Barbosa R, Marcolino A, de Jesus Guirro R, Mazzer N, Barbieri C, Fonseca M. Efeito do *laser* de baixa intensidade (660 nm) na regeneração do nervo isquiático lesado em ratos. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2010;17(4): 294-9.
16. Barbugli PA. Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2010.
17. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology Semin. *Cutan. Med. Surg.* 2008; 27(4) 227–38.
18. Barolet D, Boucher A, Bjerring P. In vivo human dermal collagen production following LED-based therapy: the importance of treatment parameters. *Lasers Surg Med*. 2005;17:76.
19. Barolet D, Roberge CJ, Auger FA, Germain L. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study *J Investig Dermatol*. 2009;129(12):2751–9.
20. Bozzini G, Colin P, Betrouni N, Maurage C, Leroy X, Simonin S, et al. Efficiency of 5-ALA mediated photodynamic therapy on hypoxic prostate cancer: A preclinical study on the Dunning R3327-AT2 rat tumor model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(3):296-303.
21. Braathen L, Morton C, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Gerritsen M, Gilaberte Y, et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(9):1063-6.
22. Bronner M, Overholt B, Taylor S, Haggitt R, Wang K, Burdick J, et al. Squamous overgrowth is not a safety concern for photodynamic therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastroenterology*. 2009;136(1):56-64.
23. Carvalho JM; Flores CAT; Freitas JS. Aplicação do Diodo Emissor de Luz Infravermelha no tratamento da dor fibromiálgica. *Revista Dor*. 2009; 10(4):331-6.
24. Casara C, Eidt L, Cunha V. Estudo de prevalência das dermatoses encaminhadas ao setor de fototerapia do ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013;88(2):211-5.
25. Castro IC, Rosa CB, dos Reis Júnior JA, Moreira LG, Aragão JS, Barbosa AF, et al. Assessment of the use of LED phototherapy on bone defects grafted with hydroxyapatite on rats with iron-deficiency anemia and nonanemic: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(5):1607-15.
26. Chin W, Heng P, Thong P, Bhuvaneswari R, Hirt W, Kuenzel S, et al. Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence

diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;69(3):1083-93.

27. Choudhary S, Keyvan N, Elsaie LM. *Lasers* Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med Sci*. 2009;24:971-80.

28. Costa Lino MDM, Carvalho FB, Moraes MF, Cardoso JA, Pinheiro ALB, Ramalho LMP. The effects of photobiomodulation on healing of bone defects in streptozotocin induced diabetic rats. *Proceedings SPIE 7887, Mechanisms for Low-Light Therapy VI*; 2011 fev 17;6:78870G.

29. Couto JPA. Análise comparativa da terapia com LED (640±20nm) e *laser* (660nm) sobre o processo de reparação cutânea em ratos idosos [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2009.

30. Cremonese CCK. Tecnologias limpas aplicadas à otimização de processo de identificação de *Candida spp.* por espectroscopia no infravermelho [Dissertação de mestrado]. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul; 2013.

31. Cristescu R, Popescu C, Dorcioman G, Miroiu F, Socol G, Mihailescu I, et al. Antimicrobial activity of biopolymer--antibiotic thin films fabricated by advanced pulsed *laser* methods. *Applied Surface Science* 2013;278:211-3.

32. Croft S, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection*. 2011;17(10):1478-83.

33. Cury V, Moretti A, Assis L, Bossini P, de Souza Crusca J, Neto C, et al. Low level *laser* therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;125:164-70.

34. Dai T, De Arce V, Tegos G, Hamblin M. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(12):5710-7.

35. Dehta F, Ghom A, Dehta P, Deoghare A. Photochemotherapy (PUVA): An Overview. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine & Radiology*. 2010;22(3):141-3.

36. Demidova T, Hamblin M. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2329-35.

37. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic Therapy Targeted To Pathogens. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2004;17(3):245-54.

38. Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant turnours. *Lancet*. 1972; 2(7788):1175-7.

39. Dourado K, Junior L, de Paulo R, Gomes A, Cavallieri R. LEDterapia. Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 2011;15(6):231-48.

40. Dovigo L, Pavarina A, Ribeiro A, Brunetti I, Costa C, Jacomassi D, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochemistry and Photobiology*. 2011;87(4):895-903.
41. Dutta S, Ongarora B, Li H, Maria da Graça H, Kolli B, Chang K. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. *PLoS One*. 2011;6(6):20786.
42. Egli R, Schober M, Hempfing A, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Sensitivity of osteoblasts, fibroblasts, bone marrow cells, and dendritic cells to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2007;89(2):70-7.
43. Eljamel M. Photodynamic assisted surgical resection and treatment of malignant brain tumours technique, technology and clinical application. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1(1):93-9.
44. Endo C, Miyamoto A, Sakurada A, Aikawa H, Sagawa M, Sato M, et al. Results of long-term follow-up of photodynamic therapy for roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma. *CHEST Journal*. 2009;136(2):369-75.
45. Esmaeelinejad M, Bayat M, Darbandi H, Bayat M, Mosaffa N. The effects of low-level *laser* irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):121-9.
46. Fahmy IR, Abu-Shady H. The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukoderma. *Quarterly journal of pharmacy and pharmacology*. 1948;21(4):499-503.
47. Fekrazad R, Bargrizan M, Sajadi S, Sajadi S. Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin® against *Streptococcus mutans* (an in vitro study). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(3):249-53.
48. Fink L, Holschermann H, Kwapiszewska G, Muyal J, Lengemann B, Bohle R, et al. Characterization of platelet-specific mRNA by real-time PCR after *laser*-assisted microdissection. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart*. 2003;90(4):749-56.
49. Frare JC, Nicolau RA. Análise clínica do efeito da fotobiomodulação *laser* (GaAs-904nm) sobre a difusão temporomandibular. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. 2008;12:37-42.
50. Funayama T, Tsukanishi T, Hara I, Ozeki E, Sakane M. Tumor-selective near-infrared photodynamic therapy with novel indocyanine green-loaded nanocarrier delays paralysis in rats with spinal metastasis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(4):374-8.
51. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin M. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):2173-8.

52. Gama SKC, Habib FAL, de Carvalho JSM, et al. Tooth Movement After Infrared *laser* Phototherapy: Clinical Study in Rodents. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28: S79-83.
53. Gerbi ME. Avaliação da eficácia do *laser* de 830nm no reparo ósseo de feridas cirúrgicas associadas ou não a implante de proteínas morfogenéticas ósseas e membrana biológica. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Odontologia. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2004.
54. Gerbi ME, Limeira Júnior FA, Pinheiro ALB, et al. Assesment of bone repair associated to the use of organic bone graft and membrane with 830nm. *SPIE Lasers in Dentistry*. 2003;4950:137-43.
55. Gerbi ME, Marques AMC, Ramalho LMP, Ponzi EAC, Carvalho CM, Santos RC, et al. Infrared *Laser* Light Further Improves Bone Healing When Associated With Bone Morphogenetic Proteins: An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomed Laser Surg*, 2008;26(1):55-60.
56. Gerbi ME, Pinheiro ALB, Marzola C, et al. Assessment of Bone Repair Associated with the use of Organic Bovine Bone and Membrane Irradiated at 830nm. *Photomed. Laser Surg*. 2005;23:382-8.
57. Goto B, Iriuchishima T, Horaguchi T, Tokuhashi Y, Nagai Y, Harada T, Saito A, et al. Therapeutic Effect of Photodynamic Therapy Using Na-Pheophorbide a on Osteomyelitis Models in Rats. *Photomed Laser Surg* 2011;29(3):183-9.
58. Guglielmi CA, Simionato MR, Ramalho KM, Imperato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Optics*. 2011;16(8) 088003.
59. Sánchez Gómez A, Reza Goyanes M, Callejo Velasco D, Blasco Amaro JA. Efectividad, seguridad y coste-efectividad de la terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer de esófago y esófago de Barrett. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Agencia Laín Entralgo; 2009. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: UETS 2007/13.
60. Gondim FM, Gomes IP, Firmino F. Prevenção e Tratamento da Mucosite Oral. *Revista de Enfermagem*. 2010;18(1):67-74.
61. Grossman H, Gomella L, Fradet Y, Morales A, Presti J, Ritenour C, et al. A phase III, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*. 2007;178(1):62-7.
62. Guarino FM. Micosis fungoide en fase de placas tratada con terapia fotodinamica: resultados en 12 pacientes. *Astas Sermo-Sifiliográficas*. 2010;101(9):785-91.
63. Guarino FM. Terapia fotodinamica en micosis fungoides. *Astas Dermo-Sifiliográficas*. 2012;104(5):393-9.

64. Habib FAL, Gama SKC, Ramalho LMP, et al. Effect of *laser* Phototherapy on the Hyalinization Following Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Photomedicine and laser Surgery*. 2012;30:179-85.
65. Habib FAL, Gama SKC, Ramalho LMP, et al. *laser*-Induced Alveolar Bone Changes During Orthodontic Movement: A Histological Study on Rodents. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28:823-30.
66. Hall-Stoodley L, William Costerton J, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:95-108.
67. Hamblin MR, Mroz P. *Lasers in Photodynamic Therapy*. In: Maximilian Lackner, editor. *Lasers in Chemistry*. Weinheim: VCH Wiley Verlag GmbH & Co.; 2008.
68. Hamdoon Z, Jerjes W, Upile T, Hopper C. Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer: case study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):49-52.
69. Hasegawa GKF. Estudo da Potencialidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na desinfecção da água [Trabalho de conclusão de curso]. Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2012.
70. Hermann G, Mogensen K, Carlsson S, Marcussen N, Duun S. Fluorescence-guided transurethral resection of bladder tumours reduces bladder tumour recurrence due to less residual tumour tissue in T a/T1 patients: a randomized two-centre study. *BJU International*. 2011;108(8b):297-303.
71. Issa M, Manela-Azulay M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(4):501-11.
72. Jabłoński MB. Microchemical investigation of bone derived from mice treated with strontium indifferent chemical forms using scanning electron microscopy and micro-Raman spectroscopy. *Microchemical Journal*. 2013;108:168-73.
73. Jerjes W, Upile T, Akram S, Hopper C. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. *Clinical Oncology*. 2010;22(9):785-91.
74. Kamoshima Y, Terasaka S, Kuroda S, Iwasaki Y. Morphological and histological changes of glioma cells immediately after 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy. *Neurological Research*. 2011;33(7):739-46.
75. Karakullukcu B, van Oudenaarde K, Copper M, Klop W, van Veen R, Wildeman M, et al. Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2011;268(2):281-8.
76. Kashef N, Borghei Y, Djavid G. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(2):150-5.

77. Kharkwal G, Sharma S, Huang Y, Dai T, Hamblin M. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011;43(7):755-67.
78. Sionato M, Ramalho K, Imparato J, Pinheiro S, Luz M. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(8): 088003.
79. Khouri V, Stracieri A, Rodrigues M, Moraes D, Pieroni F, Simões B et al. Use of therapeutic *laser* for prevention and treatment of oral mucositis. *Brazilian Dental Journal*. 2009; 20(3):215-20.
80. Karu TI. Low-Power *Laser* Therapy. In: Vodinh T. Biomedical photonics handbook. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 1-25.
81. Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(5):1091-9.
82. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS, Lobko VV. Different responses of proliferating and resting tumour cells to pulsed high repetition rate low-intensity *laser* light at 271 nm. *Laser Chemistry* 1983;1(3):153-61.
83. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS, Lobko VV. Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. *Il Nuovo Cimento D*. 1982;1(6):828-40.
84. Karu TI, Tiphlova OA, Letokhov VS, Lobko VV. Stimulation of E.coli growth by *laser* and incoherent red light. *Il Nuovo Cimento D*. 1983; 2(4):1138-44.
85. Kranendonk AA, Van der Reijden WA, Van Winkelhoff AJ, Van der Weijden GA. The bactericidal effect of a Genius Nd:YAG *laser*. *Int J Dent Hyg*. 2010;8(1):63-67.
86. Lambrechts S, Aalders M, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(5):2026-34.
87. Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. A efetividade do *laser* de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2012;19(3):290-6.
88. LeBlanc D, Story R, Gross E. *laser*-induced inactivation of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 2012;11(1):267.
89. Lee JW, Kim BJ, Kim MN. Photodynamic therapy: new treatment for recalcitrant *Malassezia* folliculitis. *Lasers Surg. Med*. 2010; 42(2): 192-6.
90. Li J, Chen Z, Huang Z, Zhan Q, Ren F, Liu J, et al. In vitro study of low intensity ultrasound combined with different doses of PDT: Effects on C6 glioma cells. *Oncology Letters*. 2013;5(2):702-6.
91. Lima A, Antequera R, Peres M, Snitcosky I, Federico M, Villar R. Efficacy of low-level *laser* therapy and aluminum hydroxide in patients with chemotherapy and radiotherapy-induced oral mucositis. *Brazilian Dental Journal*. 2010;21(3):186-92.

92. Lins R, Dantas E, Lucena K, Catao M, Granville A, Neto L. Efeitos bioestimulantes do *laser* de baixa potência no processo de reparo. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(6):849-55.
93. Longo J, Lozzi S, Azevedo R. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. *RGO*. 2011;59:51-7.
94. Lopes CB, Pacheco MTT, Silveira L, et al. The effect of the association of near infrared *laser* therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study. *Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2010;94:1257-63.
95. Lopes CB, Pinheiro ALB, Sathaiiah S, et al. Infrared *laser* Light Reduces Loading Time of Dental Implants: A Raman Spectroscopic Study. *Photomedicine and laser Surgery*. 2005;23: 27-31.
96. Lopes CB, Pinheiro ALB, Sathaiiah S, Silva NS, Salgado MAC. Infrared *Laser* Photobiomodulation (λ 830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007;25(2): 96-101.
97. Lyon J, Rezende R, Rabelo M, de Lima C, Moreira L. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2013;175(1-2):159-64.
98. Maclean M, Murdoch L, MacGregor S, Anderson J. Sporicidal Effects of High-Intensity 405 nm Visible Light on Endospore-Forming Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 2013;89(1):120-6.
99. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9(8):947-83.
100. Mang T, Mikulski L, Hall R. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010;7(2):98-105.
101. Martines NS, Machado AHA, Silva NS, Tedesco AC, Zângaro RA, Pacheco-Soares C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2007;36(1):59-64.
102. Meirelles GCS, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro ALB. A Comparative Study of the Effects of *Laser* Photobiomodulation on the Healing of Third-Degree Burns: A Histological Study in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(2):159-66.
103. Meyer P, de Araújo H, Carvalho M, et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. *Fisioterapia Brasil*. 2010;11(6):428-32.
104. Minatel D, Enwemeka C, Francca S, Frade M. Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009;84 (3):279-83.

105. Montazerabadi A, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi M, Ahmadi A, Shakeri-Zadeh A, Aledavood A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012;9(1):46-51.
106. Montazerabadi A, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi M, Ahmadi A, Aledavood A. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012;109:42-9.
107. Mattiello F, Coelho A, Martins O, Mattiello R, Ferrão Júnior J. In vitro effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus sanguinis*. *Brazilian Dental Journal*. 2011;22(5):398-403.
108. Nagy EM, Dalla Via L, Ronconi L, Fregona D. Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(16):1863-76.
109. Natal AMD. Influência do pH na interação do Photofrin®, Photogem® e Photosan® com DMPC e lipoproteína de baixa densidade [Dissertação de Mestrado] [Internet]. [Cited 2014 Apr 28]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos; 2007. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-27032008-110609/>.
110. Neves D, Ramos D, Magalhães G, Rodrigues R, Souza J. Terapia fotodinâmica para tratamento de múltiplas lesões no couro cabeludo na síndrome do neovasocelular. Relato de caso. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85(4):545-8.
111. Neves L, Marcolino A, Prado R, Thomazini J. *laser* 830nm na viabilidade do retalho cutâneo de ratos submetidos à nicotina. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2011;19(6):342-5.
112. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):89-96.
113. Nitzan Y, Pechatnikov I. Approaches to kill gram-negative bacteria by photosensitized processes. In: Hamblin MR, Jori G. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. Reino Unido: RSC Publishing; 2011. p. 45-67.
114. Nowak-Stępniewska A, Malecki M, Wiktorska K, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)₂-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cell lines. Part I. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):39-48.
115. Nowak-Stępniewska A, Wiktorska K, Małcki M, Romiszewska A, Padzik-Graczyk A. Cytotoxicity of PP(Arg)(2)- and Hp(Arg)(2)-mediated photodynamic therapy and early stage of apoptosis induction in prostate carcinoma in vitro. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):497-505.

116. Nucci V, Torchia D, Cappugi P. Treatment of anogenital condylomata acuminata with topical photodynamic therapy: report of 14 cases and review. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:280-2.
117. Oliveira JR, Duarte DF, Gonçalves LD, Souza FVP, Silva JCO, Silva UTG. Aplicabilidade do *laser* Biospeckle nas Ciências Agrárias. In: II Semana de Ciência e Tecnologia IFMG, II Jornada Científica; 2009 out 19-23; Campus Bambuí.
118. Oliveira F, Pereira V, Trindade A, Shimano A, Gabriel R, Borges A. Ação do *laser* terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica; Action of therapeutic *laser* and ultrasound in peripheral nerve regeneration. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2012;20(2):98-103.
119. Papini E, Bizzarri G, Bianchini A, Valle D, Misischi I, Guglielmi R, et al. Percutaneous ultrasound-guided *laser* ablation is effective for treating selected nodal metastases in papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;98(1):92-7.
120. Park K, Han T, Kim I, Yeo I, Kim B, Kim M. The Effects of 830 nm light-emitting diode therapy on acute herpes zoster ophthalmicus: a pilot study. *Annals of Dermatology*. 2013;25(2):163-7.
121. Patriota R, Rodrigues C, Cucé L. Luz intensa pulsada no fotoenvelhecimento: avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011;86(6):1129-33.
122. Peloi L, Biondo C, Kimura E, Politi M, Lonardon M, Aristides S, et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*). *Experimental Parasitology*. 2011;128(4):353-6.
123. Pereira C, Costa A, Carreira C, Junqueira J, Jorge A. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):859-64.
124. Pereira S. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract cancer: the United Kingdom experience. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2012;10(Suppl 2):48.
125. Perussi J. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*. 2007;30(4):988.
126. Pileggi G, Wataha J, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis and photodynamic Therapy*. 2013;10(2):134-40.
127. Pinheiro ALB, Aciole GTS, Cangussú MCT, et al. Effects of *laser* phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration: A Raman spectroscopic study. *Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2010;95:1041-7.

128. Pinheiro ALB, Brugnera Jr, Zanin FAA. Aplicação do *Laser* na Odontologia. São Paulo: Santos. 2010;428.
129. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photobioenerginingering of the bone repair process. *Photomedicine and laser Surgery*. 2006;24,169-78.
130. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM, Limeira Jr FA, et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red *laser* photobiomodulation: a histological study in a rodent mode. *Lasers Med Sci*. 2009;24: 234-40.
131. Pinheiro ALB, Gerbi MEMM, Ponzi EAC, et al. Infrared *laser* Light Further Improves Bone Healing When Associated with Bone Morphogenetic Proteins and Guided Bone Regeneration: An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomedicine and laser Surgery*. 2008;26:167:74.
132. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of 830nm *laser* light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseus membrane. *Journal of Clinical laser Medicine and Surgery*. 2003;21:383-88.
133. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of low level *laser* therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Brazilian Dental Journal*. 2003;14:177-81.
134. Pinheiro ALB, Limeira Jr FA, Gerbi MEMM, et al. Effect of 830nm *laser* Light on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone and Decalcified Cortical Osseous Membrane, *Journal of Clinical laser Medicine and Surgery*. 2003;21:383-8.
135. Pinheiro ALB, Lopes CB, Pacheco MTT, et al. Raman Spectroscopy Validation of DIAGNOdent-Assisted Fluorescence Readings on Tibial Fractures Treated with *laser* Phototherapy, BMPs, Guided Bone Regeneration, and Miniplates. *Photomedicine and laser Surgery*. 2010;28:S89-97.
136. Pinheiro ALB, Oliveira MAM, Martins PPM. Biomodulação da cicatrização óssea pós-implantar com o uso da laserterapia não-cirúrgica: Estudo por microscopia eletrônica de varredura. *Revista da FOUFBA*. 2001;22:12-9.
137. Pinheiro ALB, Santos NRS, Oliveira PC. The efficacy of the use of IR *laser* phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative *laser* fluorescence and Raman spectral study on rabbits. *Lasers Med Sci*. 2013;28:815-22.
138. Pinheiro ALB, Soares LGP, Aciole GTS, et al. Light microscopic description of the effects of *laser* phototherapy on bone defects grafted with mineral trioxide aggregate, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration in a rodent model. *J Journal Biomedical Material Research. Part A*. 2011;98:212-21.
139. Pinheiro ALB, Soares LGP, Barbosa AFS, Ramalho LMP, Santos JN. Does LED phototherapy influence the repair of bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration? A description of the repair process on rodents. *Lasers Med Sci*. 2012;27:1013-24.

140. Pinheiro ALB, Soares LGP, Cangussú MCT, et al. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers Med Sci.* 2012;27:903-16.
141. Pinheiro ALB, Ramalho LMP. Effect of IR *laser* photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):313-7.
142. Powell K, Low P, McDonnell P, Laakso E, Ralph S. The effect of *laser* irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. *Photomedicine and laser Surgery.* 2010;28(1):115-23.
143. Prates R, Kato I, Ribeiro M, Tegos G, Hamblin M. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;66(7):1525-1532.
144. Prates R, Silva E, Suzuki L, Paula C, Ribeiro M. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. *Revista Brasileira de Física Médica.* 2010;4(1):53-7.
145. Queiroga AS. Avaliação a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre a inativação de espécies do gênero *Candida*: estudo *in vitro* [Tese de Doutorado]. Programa Integrado de Doutorado em Odontologia UFPB/UFBA. João Pessoa: UFPB/UFBA; 2010.
146. Reis FA, Belchior ACG, Nicolau RA, Fonseca TS, Carvalho PTC. Efeito da terapia com *laser* de arsenieto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome se seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Brazilian Journal of Physical Therapy.* 2008;12(3):215-21.
147. Riso NDM, Ferrari TA, Ciarlina LDRP, Louzada MJQ. *laser* Terapêutico no Reparo Ósseo de Ratos Submetidos a Ausência de Carga. *Veterinária e Zootecnia.* 2010;17(2):250-8.
148. Ritter C, Kuhl I, Lenhardt C, Weissbluth M, Bakos R. Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico e luz de diodos em ceratoses actínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2010;85(5):639-45.
149. Robertson C, Evans D, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2009;96(1):1-8.
150. Ronnest N, Stocks S, Lantz A, Germaey K. Comparison of *laser* diffraction and image analysis for measurement of *Streptomyces coelicolor* cell clumps and pellets. *Biotechnology Letters.* 2012;34(8):1465-73.
151. Rosa CB, Castro Vieira IC, Reis Júnior JA et al. The efficacy of the use of IR *laser* phototherapy (LPT) on bone defect grafted with biphasic ceramic on rats with iron deficiency anemia: Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):1251-9.

152. Rosa CB, Habib FAL, Araújo TM. Effect of the *laser* and light-emitting diode (LED) phototherapy on midpalatal suture bone formation after rapid maxilla expansion: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):859-67.
153. Salate A, Barbosa G, Gaspar P, Koeke P, Parizotto N, Benze B, et al. Effect of In-Ga-Al-P diode *laser* irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomedicine and Laser Therapy*. 2005;23(5):470-5.
154. Samkoe K, Chen A, Rizvi I, O'Hara J, Hoopes P, Pereira S, et al. Imaging tumor variation in response to photodynamic therapy in pancreatic cancer xenograft models. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2010;76(1):251-9.
155. Sampaio S, Monteiro J, Cangussú M, Santos G, dos Santos M, dos Santos J, et al. Effect of *laser* and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):799-806.
156. Santos AJD. Efeitos da terapia com *laser* baixa potência em melanoma: ensaios *in vitro*. [Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais]. São Paulo: Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares; 2013.
157. Santos PM. Marcação radioativa e Biodistribuição de um Fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica. [Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas]. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 2012.
158. Santos T, Piva M, Ribeiro M, Antunes A, Melo A, Silva E. *Laser*therapy efficacy in temporomandibular disorders: control study. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2010;76(3):294-9.
159. Selman S. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2007;4(1):26-30.
160. Silva E, dos Santos E, Ricci-Júnior E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *Revista Brasileira de Farmácia*. 2009;90(3):211-7.
161. Silva RC. Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2007.
162. Simplício F, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*. 2002;25(5):801-7.
163. Siqueira, IAWB. Ação do *laser* de baixa potência na produção de metabólitos secundários do dermatófito *Trichophyton rubrum*. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Univap; 2011. 48p.
164. Soares LGP, Magalhães Junior EB, Magalhães CA, Ferreira CF, Marques AMC, Pinheiro ALB. New Bone Formation around Implants Inserted on Autologous and

Xenografts Irradiated or not with IR *laser* Light: A Histomorphometric Study in Rabbits. Brazilian Dental Journal. 2013;24:218-23.

165. Soares LGP, Marques AMC, Aciole JMS, et al. Assessment *laser* phototherapy on bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular HA + β -tricalcium phosphate: histological study in an animal model. Proc. SPIE 8932, Mechanisms for Low-Light Therapy. 2014;IX:893211.

166. Soares LGP, Marques AMC, Aciole JMS, et al. Do *laser*/LED phototherapies influence the outcome of the repair of surgical bone defects grafted with biphasic synthetic microgranular HA + β -tricalcium phosphate? A Raman spectroscopy study. Lasers Med Sci. 2014;29(5):1575-84.

167. Soares LGP, Marques AMC, Guarda MG, Aciole JMS, Santos JN, Pinheiro ALB. Influence of the λ 780 nm *laser* Light on the Repair of Surgical Bone Defects Grafted or not with Biphasic Synthetic Micro-Granular Hydroxylapatite + Beta - Calcium Triphosphate. Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology. 2014;131:16-23.

168. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. Lasers Surg Med. 1996;18(3):253-9.

169. Souza C, Felício L, Ferreira J, Kurachi C, Bentley M, Tedesco A, et al. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode *laser* single session for non-melanoma skin cancer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009;6(3):207-13.

170. Szeimies R, Matheson R, Davis S, Bhatia A, Frambach Y, Kloevekorn W, et al. Topical Methyl Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy Using Red Light-Emitting Diode Light for Multiple Actinic Keratoses: A Randomized Study. Dermatologic Surgery. 2009;35(4):586-92.

171. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, et al. Photodynamic Therapy Can Induce a Protective Innate Immune Response against Murine Bacterial Arthritis via Neutrophil Accumulation. PLoS One. 2012;7(6):e39823.

172. Tardivo JP, Baptista MS. Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy. Photomed Laser Surg. 2009;27(1):145-50.

173. Tardivo J, Wainwright M, Baptista M. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012;9(2):118-21.

174. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. Medicina (Ribeirão Preto). 2008; 41(3):259-64.

175. Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode *laser*. Photomedicine and laser surgery. 2013;31(4):155-62.

176. Torezan L, Niwa A. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações; Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009;84(5):445-59.
177. Torres CS, Santos JN, Pinheiro ALB, et al. Does the Use of *laser* Photobiomodulation, bone Morphogenetic Proteins, and Guided Bone Regeneration Improve the Outcome of Autologous Bone Grafts? An in Vivo Study in a Rodent Model. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008;26:371-7.
178. Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink R, et al. Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *The Journal of Urology*. 2007;178(5):1974-9.
179. Triesscheijn M, Baas P, Schellens J, Stewart F. Photodynamic therapy in oncology. *The Oncologist*. 2006;11(9):1034-44.
180. Trushina O, Novikova E, Sokolov V, Filonenko E, Chissov V, Vorozhtsov G. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2008;5(4):256-9.
181. Tserkovsky DA, Alexandrova EN, Chalau VN, Istomin YP. Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies with photolon on a glioma C6 tumor model. *Exp Oncol*. 2012;34(4):332-5
182. Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Hayashi H, Ohtani K, Maehara S, et al. Outcome of photodynamic therapy using NPe6 for bronchogenic carcinomas in central airways > 1.0 cm in diameter. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(7):2198-204.
183. Volpato LER. Avaliação do uso do *laser* de baixa intensidade e do Light Emitting Diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico [Tese de Doutorado em Odontologia]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2009.
184. Wainwright M. Methylene blue derivatives – suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000;16(4):381-94.
185. Wainwright M. Photoantimicrobials – So what’s stopping us? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009; 6(3):167-9.
186. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998;42(1):13-28.
187. Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(4):263-72.
188. Weber JBB, Pinheiro ALB, de Oliveira MG, et al. *laser* Therapy Improves Healing of Bone Defects submitted to Autologous Bone graft. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006;24:38-44.

189. WHO/TDR. For Research on Diseases of Poverty [Internet]. [Cited 2013 Jul 17]. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/african-trypanosomiasis/en/index.html>.
190. Xu J, Xiang L, Chen J, He Q, Li Q, Li J, et al. The combination treatment using CO₂ laser and photodynamic therapy for HIV seropositive men with intraanal warts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(2):186-193.
191. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch. Oral Biol*. 1992; 37:883–887.
192. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J. Dent*. 1994;22:273–278.