

MAÍRA SILVA DA COSTA

**POTÊNCIA DO *LASER* DE BAIXA
INTENSIDADE NA VIABILIDADE DO
RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO, EM
RATOS.**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2009

MAÍRA SILVA DA COSTA

**POTÊNCIA DO *LASER* DE BAIXA
INTENSIDADE NA VIABILIDADE DO
RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO, EM
RATOS.**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LYDIA MASA KO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. HEITOR CARVALHO GOMES

Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI

SÃO PAULO

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADORA: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais NONATO e SOCORRO e aos meus irmãos ROSE, MAYARA E RENATO, como retribuição por todo amor e confiança que depositaram em mim e em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante este estudo, pelo exemplo de liderança, pelo conhecimento transmitido e pelas oportunidades concedidas.

Ao **Prof. HEITOR FRANCISCO DE CARVALHO GOMES**, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia- Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelo companheirismo e por ter se mostrado um verdadeiro amigo. Agradeço pelos estímulos e pelos momentos agradáveis que tivemos durante esse tempo e tenho certeza que sempre permaneceremos com essa amizade.

Ao **Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI**, Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela parceria, orientação e grande amigo que é e por ter me acompanhado desde antes da minha entrada no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Plástica da UNIFESP.

Ao **Prof. VICTOR EDUARDO ARRUIA ARIAS**, Médico assistente do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, por toda ajuda, empenho e aprendizado nas avaliações das lâminas. Sou muito grato pela disposição e paciência.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE DOS REIS SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela imensa dedicação, carinho e respeito com que me trataram durante esses momentos.

Ao meu grande amigo **TIAGO SILVEIRA**, companheiro de Pós-Graduação, presente em todas as etapas da pesquisa, desde a etapa experimental à formatação da tese escrita e apresentação oral, agradeço todo o aprendizado e experiências compartilhadas.

Aos amigos **PASCALE TACANI, VIVIANE WOOD, MARCO NEVES, RAFAEL GOBBATO, ANDRÉ PIRES, FABIANE FURTADO, MARIA JOSÉ, ALOUISE E LUIS ROSSETO**, colegas de pós-graduação, pelas correções e opiniões feitas na tese escrita e na apresentação oral.

Aos amigos e amigas desse Programa de Pós-Graduação: **RENATA ANDRADE BITAR CARTER, ÉRIKA MALHEIROS BASTOS, PIERANGELO ANGELLETTI, ANTONIO CARLOS ALOISE, MARIA LUIZA CHRISTOVÃO RAMOS, MARIA JOSÉ AZEVEDO**

DE BRITO ROCHA, SERGIO TAKEJI MITSUDA, MARIO JORGE WARDE FILHO, GRAZIELA CHACON BORBA, JULIETA MARIA FERREIRA CHACON, pela colaboração e críticas acerca do conteúdo e forma da tese realizada durante toda construção da mesma.

A todos os Professores Orientadores e Colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP pelas críticas sempre construtivas que fizeram com que eu compreendesse que tenho muito ainda o que aprender. Vocês foram fundamentais para realização desse sonho e serão essenciais daqui pra frente.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

“Muda, que quando a gente muda o mundo muda com a gente.

A gente muda o mundo na mudança da mente.

E quando a mente muda a gente anda pra frente.”

GABRIEL PENSADOR (Até quando?)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
EPÍGRAFE	Viii
LISTAS.....	X
RESUMO	Xiii
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.OBJETIVO	7
3.LITERATURA.....	9
4.MÉTODOS.....	18
5.RESULTADOS.....	33
6.DISSCUSSÃO.....	40
7.CONCLUSÃO.....	51
8.REFERÊNCIAS.....	53
NORMAS ADOTADAS.....	63
ABSTRACT.....	65
APÊNDICES	68

Lista de Figuras

Figura 1.	Locais de irradiação do laser sobre e ao redor do retalho.	21
Figura 2.	Animal depilado com as demarcações do retalho cutâneo randômico 10X4cm.	23
Figura 3.	Elevação do retalho contendo pele e panículo carnosos.	23
Figura 4.	Interposição de uma barreira plástica de filme impermeável sobre o leito doador.	24
Figura 5.	Sutura de toda extensão do retalho com pontos simples de náilon monofilamentar 4-0.	24
Figura 6.	Aparelho emissor de irradiação <i>Laser</i>	25
Figura 7.	Aplicação do <i>laser</i> com molde dos pontos de aplicação	26
Figura 8.	Demarcação do comprimento do retalho e da área de necrose	28
Figura 9.	Mensuração em pixels da área total do retalho assim como da área da necrose no <i>software</i> Adobe Photoshop.	29
Figura 10.	Seleção dos quatro fragmentos a partir da base cranial para análise microscópica.	31
Figura 11.	Gradeado, com 100 pontos sobreposto à fotomicrografia.	32
Figura 12.	Médias das porcentagens de necrose tecidual do grupo controle, grupo 30mW e grupo 60mW.	37
Figura 13.	Médias das porcentagens de Densidade vascular do grupo controle; Grupo 30mW; Grupo 60mW.	40
Figura 14.	Fotomicrografias dos Grupos Controle, 30mW e 60mW	41

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal, avaliador 1 e avaliador 2, em relação ao grupo.	35
Tabela 2.	Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação ao grupo	36
Tabela 3.	Comparação das porcentagens da densidade vascular de cada animal para avaliador 1 e avaliador 2.	38
Tabela 4	Comparação entre grupos em relação à densidade vascular.	39

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AlGaInP	Alumínio- Galio- Indo- Fósforo
GaAIAS	Arseneto de Gálio Aluminizado
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
λ	Comprimento de Onda
g	Gramma
He-Ne	Hélio-neônio
Hz	Hertz
J/cm ²	Joule por centímetro ao quadrado
Kg	Kilograma
<i>LASER</i>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
mW	Miliwatt
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
dpi	Pontos por polegada
%	Porcentagem
*	Significância Estatística
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

RESUMO

Introdução: O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico freqüente na cirurgia plástica, essencialmente nas perdas de substâncias, sendo fundamental na reconstrução funcional e estética de deformidades traumáticas, congênitas ou de origem neoplásica. A insuficiência arterial do retalho é a principal complicação que, se duradoura, pode levar à necrose. O *laser* de baixa intensidade tem merecido destaque por promover aumento da microcirculação, aceleração do processo cicatricial de feridas e neoformação vascular. **Objetivo:** Investigar a Potência do *laser* de baixa intensidade na viabilidade do retalho cutâneo randômico, em ratos. **Métodos:** Trinta e seis animais foram distribuídos aleatoriamente em grupo controle; grupo tratado com potência de 30mW e grupo tratado com potência de 60mW. Em ambos os grupos tratados foi utilizado a fluência de 3J/cm². O retalho cutâneo foi realizado nos animais com uma barreira plástica interposta entre o retalho e o leito doador. A irradiação *laser* foi aplicada imediatamente após a operação e nos dias 1, 2, 3 e 4 após a operação. As porcentagens das áreas de necroses dos retalhos foram calculadas no 7º dia pós-operatório. Adicionalmente, 4 fragmentos de cada retalho foram coletados para calcular a densidade vascular segundo método bidimensional. **Resultados:** Os animais tratados mostraram a área de necrose estatisticamente menor do que o grupo controle (53%). A necrose nos grupos tratados foi 24% (grupo 30mW) e 25% (grupo 60mW). Quanto à densidade vascular, os animais tratados demonstraram aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (37%), O grupo 30mW apresentou 57% de densidade vascular e o grupo 60mW apresentou 59%. **Conclusão:** O *laser* de baixa intensidade foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico, não havendo diferenças entre as potências utilizadas. **Palavras chaves:** Terapia a *Laser* de Baixa Intensidade, Necrose, Retalhos cirúrgicos, Microcirculação, Rato.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico freqüente na cirurgia plástica, essencialmente nas perdas de substâncias, sendo fundamental na reconstrução funcional e estética de deformidades traumáticas, congênitas ou de origem neoplásica (FERREIRA *et al.*, 1986; FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1987; IM, LEE, HOOPES, 1990; FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1995). A principal e mais temida complicação, responsável por falha nesse tipo de retalho, é a isquemia (FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1995; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; GUERARDINI *et al.*, 1999). Esta, se persistente, pode evoluir para necrose tecidual, ocasionando novas intervenções cirúrgicas, resultando em um aumento no período de internação e retardo na volta do paciente às suas atividades da vida diária (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999).

As complicações de um retalho cutâneo podem ser atribuídas a causas extrínsecas e intrínsecas. As primeiras incluem condições sistêmicas (infecção, estase venosa, desnutrição e hipotensão), locais (compressão, tensão e trombose na anastomose do pedículo) e planejamento inadequado. Essas causas extrínsecas podem ser minimizadas por meio de cuidados pré e pós-operatórios adequados. O fator intrínseco conhecido é a diminuição do fluxo sanguíneo ao longo do retalho, devido à insuficiência arterial (por secção de vasos sanguíneos cutâneos) (KERRIGAN, 1983; FERREIRA,

ANDREWS, FILHO, 1995; SALMI, HONG, FUTRELL, 1999; ESTEVES *et al.*, 2005).

Na tentativa de realizar retalhos cutâneos com melhores perspectivas em relação à perfusão vascular, diversos cirurgiões passaram a pesquisar mecanismos e alguns possíveis coadjuvantes, que podem auxiliar na viabilidade dos retalhos, tentando, assim, melhorar o aporte sanguíneo dos mesmos (KERRIGAN, 1983; FERREIRA *et al.*, 1986; FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1987; FERREIRA *et al.*, 1988; FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1995; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; GUERARDINI *et al.*, 1999; SALMI, HONG, FUTRELL, 1999).

Desde então, várias técnicas têm sido utilizadas para aumentar a viabilidade dos retalhos cutâneos. Destacam-se os trabalhos relacionados com a utilização de recursos não farmacológicos, como acupuntura (JANSEN *et al.*, 1989) e eletroacupuntura (NIINA *et al.*, 1997), *laser* de baixa intensidade (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005) e correntes elétricas de baixa frequência polarizadas (IM, LEE, HOOPE, 1990) e não polarizadas (KJARTANSSON & LUNDEBERG, 1990; LIEBANO, FERREIRA, NETO, 2002; SANTOS *et al.*, 2004).

Atualmente, a utilização do *laser* de baixa intensidade tem merecido destaque pela facilidade de aplicação e pelos resultados satisfatórios e animadores. Dessa forma, passou a ser estudado como possível recurso adjuvante em retalhos isquêmicos (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005), e no retalho musculofasciocutâneo transversal do abdome (TRAM) (PINFILDI *et al.*, 2008)

Acredita-se que a utilização do *laser* de baixa intensidade promova aumento da microcirculação, indução da angiogênese e aceleração do processo cicatricial de feridas (MESTER, MESTER, MESTER, 1985; KAMI *et al.*, 1985; OHSHIRO, FUJINO, 1993; BISHT *et al.* 1999; SCHINDL *et al.*, 1999; AMIR *et al.*, 2000; LOW, REED, 2001; KITCHEN, 2003), favorecendo dessa forma os retalhos isquêmicos. Com o propósito de melhorar a viabilidade dos retalhos cutâneos, vários estudos foram realizados com a terapia *laser* de baixa intensidade (ASSIS *et al.*, 2005; KAMI *et al.*,1985; SMITH *et al.*, 1992; OSHIRO & FUJINO, 1993; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2008). Entretanto, existem discrepâncias nestes estudos em relação à padronização dos parâmetros dessa terapia. A eficácia da terapia a *laser* de baixa intensidade é dependente de variáveis, como: comprimento de onda, potência, fluência, área da secção transversal do feixe, energia total emitida, técnica de aplicação e frequência de tratamento (BASFORD, 1995; SCHINDL *et al.*, 2000; ALMEIDA-LOPES *et al.*,2001; REDDY, 2003, BOSSINI *et al.*, 2009).

Estudos que utilizaram *lasers* com diferentes fluências encontraram resultados significativos no aumento da viabilidade do retalho (AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009) contudo, divergiram em relação aos outros parâmetros como a potência. Grande parte dos estudos em retalhos cutâneos utilizaram *laser* vermelho visível e infravermelho com potência de 30mW (PRADO *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*,2009) e obtiveram aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos, assim como KUBOTA & OSHIRO (1996) que utilizaram

potência de 60mW do *laser* infravermelho, sendo este um parâmetro mais elevado quando relacionado ao *laser* vermelho.

Como a Terapia a *laser* oferece a possibilidade de uso de diferentes potências, são necessários trabalhos com o intuito de investigar a potência do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalho cutâneo randômico, em ratos.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar a potência do *laser* de baixa intensidade, na viabilidade de retalho cutâneo randômico, em ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

McFARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965), desenvolveram modelo experimental para estudo e prevenção da necrose no retalho cutâneo randômico, no rato. O retalho tinha como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, medindo 10 cm de comprimento e 4 cm de largura, obtendo assim, proporção entre comprimento e largura de 2,5:1. O delineamento do retalho era realizado por meio de molde plástico, recortado nas medidas padrão. O retalho era elevado a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo fáscia superficial, panículo carnoso e pele. O retalho então foi recolocado no seu leito e suturado. O animal foi observado por vários dias para determinar a extensão da necrose do retalho. Em 94,3% dos animais houve necrose do retalho.

KERRIGAN (1983) estudou retalhos cutâneos, no porco, por meio de microesferas radioativas, com o objetivo de investigar o mecanismo fisiopatológico da necrose do retalho. Relatou que a perda poderia ocorrer por fatores extrínsecos sistêmicos e locais, mas o único fator intrínseco descrito foi a insuficiência arterial do retalho. A fisiopatologia da falha do retalho seria explicada pela secção de vasos cutâneos e terminais nervosos simpáticos durante o procedimento operatório, com diminuição nas taxas de fluxo sanguíneo em sentido distal, ao longo do retalho. A autora sugeriu que modalidades de tratamento que aumentassem o influxo arterial para o

retalho, ou estabilizassem a membrana celular em tecidos isquêmicos poderiam trazer benefícios.

KAMI *et al.* (1985), estudaram os efeitos do *laser* diodo de baixa potência (15 mW, 830 nm), na viabilidade de retalho cutâneo de base caudal, no rato. Foram utilizados 60 ratos. Grupo Controle; Grupo 2 foi irradiado no pré-operatório, durante cinco dias; Grupo 3 irradiado no pós-operatório, também por cinco dias. A radiação foi aplicada em 18 pontos horizontais, igualmente distribuída ao longo do retalho. Cada ponto foi irradiado durante 20 segundos por dia, por cinco dias consecutivos. A fluência utilizada foi de 16 J/cm². As áreas de necrose nos retalhos foram comparadas e mensuradas sete dias após o ato operatório, sendo 46,8% no grupo controle; 52,15% no de irradiação pré-operatória e 53,11% no de irradiação pós-operatória. Concluíram que houve aumento significativo na área de viabilidade do retalho nos grupos submetidos à radiação *laser*, em relação ao controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Segundo os autores, esse aumento na viabilidade do retalho ocorreu devido à proliferação de vasos sanguíneos ao redor dos pontos irradiados e ao aumento do fluxo sanguíneo.

KUBOTA & OHSHIRO (1996), observaram os efeitos da radiação *laser* em retalho cutâneo num único ponto localizado no centro da base caudal do retalho, no rato, por meio da fluxometria por *laser* Doppler, avaliando a microcirculação no retalho irradiado e a viabilidade do retalho. Vinte ratos foram divididos em dois grupos, com dez animais cada, sendo o primeiro o grupo controle (falsa irradiação). O segundo grupo recebeu a radiação pelo *laser* diodo de arseneto de gálio aluminizado (GaAlAs de 60

mW e 830 nm), por um minuto, em ponto no centro da base do retalho. A fluência (dose) utilizada foi de 36 J/cm². Todos os animais foram submetidos à avaliação do *laser* Doppler na pré-irradiação, imediatamente pós-irradiação e 30 minutos pós-irradiação. A área de viabilidade do retalho cutâneo do grupo irradiado (68,11%) foi significativamente maior em relação ao grupo controle (60,8%).

BISHT *et al.* (1999), utilizaram o *laser* de Hélio-Neônio (632,8 nm e 5 mW de potência) em 35 ratos, tendo realizado duas incisões de 2 cm no dorso de cada animal, uma em cada lado. As incisões do lado esquerdo foram irradiadas, diariamente, durante quatorze dias, com dose de 4 J/cm², e as incisões do lado direito, não sofreram exposição à irradiação (grupo controle). Os ratos foram analisados nos 3º, 5º, 7º e 14º dias, por exame macroscópico e histológico. Também foram submetidos a teste de resistência do tecido. Nos animais do grupo experimental, a cicatrização completa das incisões ocorreu aos cinco dias, enquanto nos do grupo controle, aos sete dias, uma diferença significativa. Também houve aumento significativo na resistência dos tecidos do grupo experimental em comparação com o grupo controle. Observaram, também, que o grupo submetido à irradiação obteve epitelização precoce do tecido, com aumento na reação dos fibroblastos, infiltração leucocitária e neovascularização, somente no local irradiado.

AMIR *et al.* (2000), verificaram os efeitos da radiação *laser* em retalho cutâneo no rato. Trinta animais foram distribuídos em três grupos: grupo 1, controle, continha os animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não foram irradiados; grupo 2 foi irradiado na zona de

transição; grupo 3 foi irradiado nessa mesma zona de transição e na porção distal do retalho. Os animais do grupo 2 foram irradiados por cinco dias consecutivos após a operação, por cinco minutos, totalizando dose de 2,9 J/cm². Os animais do grupo 3 foram irradiados, nas duas regiões descritas, por dez minutos, com a mesma quantidade de energia (2,9 J/cm²). O equipamento utilizado foi o *laser* de He-Ne com potência de 6mW, comprimento de onda de 632,8 nm e feixe com 2cm de diâmetro. A análise macroscópica revelou efeitos benéficos da irradiação nos grupos 2 e 3, sendo que o grupo 2 apresentou 61,12% de tecido viável e o grupo 3, 61,8%. Na análise histológica observou-se aumento na proliferação de capilares e fibroblastos em relação ao grupo controle. O grupo 3 apresentou número de vasos sanguíneos significativamente mais elevado que o grupo 2. Segundo os autores, o principal mecanismo responsável por estes resultados foi a neovascularização. Ainda, este tipo de tratamento deve ser considerado nos casos de pacientes com retalhos que tenham maior risco de necrose, como os localizados na perna, em pacientes diabéticos ou em casos após lesão do suprimento vascular durante a operação.

KUBOTA (2002) estudou os efeitos do *laser* diodo (830 nm) no fluxo sanguíneo em retalho de base axial e na viabilidade desse retalho cutâneo, no rato. Os retalhos foram realizados em 40 animais e o fluxo sanguíneo foi avaliado mediante fluxometria pelo *laser* Doppler. Os ratos foram distribuídos em quatro grupos: grupo 1, o controle; o grupo 2 foi irradiado pelo *laser* em um único ponto sobre a artéria iliolumbar (principal vaso de irrigação do retalho); o grupo 3 foi irradiado no ponto médio da linha principal na metade proximal do retalho e o grupo 4 foi irradiado no ponto médio da linha distal na metade distal do retalho. A fluência utilizada foi de 185 J/cm². O fluxo sanguíneo foi avaliado durante a irradiação do

laser e, novamente, nos 5° e 10° minutos após a irradiação, quando o retalho foi suturado na sua posição de origem. No grupo controle foi realizado o mesmo procedimento, porém não foi irradiado com o *laser* de diodo. A avaliação do fluxo sanguíneo pelo *laser* Doppler demonstrou aumento significativo no fluxo, nos 5° e 10° minutos pós-irradiação, nos grupos experimentais, em relação ao controle. No 5° dia pós-irradiação, houve diferença significativa na área de viabilidade dos retalhos de todos os grupos, em relação ao controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Segundo o autor, essa melhora no fluxo sanguíneo e na área de viabilidade seria devida a um possível mecanismo de modulação do sistema nervoso autônomo.

PINFILDI *et al.* (2005), estudaram os efeitos do *laser* de Hélio-Neônio (632,8 nm e 10 mW) na viabilidade de retalho cutâneo randômico, em 48 ratos, que foram distribuídos em quatro grupos de 12 animais. O grupo 1 (controle) recebeu simulação de radiação *laser*. O grupo 2 recebeu radiação *laser* de He-Ne sobre o retalho, imediatamente após a operação e nos quatro dias subseqüentes. O grupo 3 foi submetido à radiação *laser* de He-Ne ao redor do retalho, imediatamente após a operação e nos quatro dias subseqüentes. O grupo 4 foi submetido à radiação *laser* de He-Ne sobre o retalho e ao redor do mesmo, imediatamente após a operação e nos quatro dias subseqüentes. Para a aplicação do *laser* de He-Ne foi padronizada a densidade de energia de 3 J/cm². Como resultado, o grupo 1 (controle) apresentou média de área de necrose de 48,86%; o 2, 38,67%; o 3, 35,34% e o 4, 22,61%. Todos os grupos experimentais tiveram resultados significantes em relação ao grupo controle, mas o grupo 4 obteve o melhor resultado em relação aos demais (p<0,001). Concluíram

que a irradiação de *laser* He-Ne foi eficiente no aumento da viabilidade desse retalho randômico, no rato.

ASSIS *et al.* (2005), estudaram a eficácia do *laser* de diodo, comprimentos de onda diferentes e duas potências diferentes, na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Utilizou-se o *laser* de diodo de 904nm (potência de 15mW) e o outro de 670nm (potência de 30mW). Foram utilizados 36 ratos, divididos em 3 grupos com 12 animais em cada, nos quais foi realizado o retalho cutâneo randômico. O grupo 1 (controle) foi submetido à simulação da radiação. O grupo 2 recebeu irradiação com o *laser* de 904nm e o grupo 3, com o *laser* de 670nm. Para as irradiações, empregou-se a técnica pontual em contato em um ponto localizado a 2,5 cm da base cranial do retalho, imediatamente após a operação e nos 4 dias subseqüentes e a fluência utilizada foi de 16j/cm². A porcentagem da área de necrose de todos os grupos foi calculada no 7º dia pós-operatório. O grupo 1 obteve média de área de necrose de 48%; o grupo 2: 37% e o grupo 3:27%. Os resultados mostraram que os dois grupos irradiados obtiveram valores estatisticamente significativos comparados ao grupo controle. O grupo 3 apresentou o melhor resultado comparado aos demais grupos desse estudo. Assim, os autores concluíram que o *laser* foi eficiente no aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em ratos e que o *laser* com comprimento de onda de 670nm operando com potência de 30mW, foi mais eficiente do que o de 904nm, com potência de 15mW.

PRADO *et al.* (2005), estudaram os efeitos do *laser* de diodo (830 nm) na viabilidade de retalho cutâneo randômico, no rato. O retalho foi

realizado em 24 ratos, divididos em dois grupos: o grupo 1 (controle) foi submetido à simulação de irradiação de *laser* de diodo (830 nm) e o grupo 2 foi submetido à irradiação do mesmo *laser* de diodo. A densidade de energia utilizada foi de 36 J/cm². Como resultado, o grupo 1 apresentou média de necrose de 48,86% e o grupo 2, de 23,14%, uma diferença significativa a favor do grupo 2.

PRADO *et al.* (2008), observaram os efeitos do *laser* de diodo (830nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico, em ratos e na determinação do local mais eficaz para aplicação da radiação *laser* na velocidade de cicatrização. Setenta ratos foram divididos em sete grupos, com 10 ratos cada: Grupo 1 (controle); grupo 2 recebeu irradiação em um ponto 5cm da base cranial do retalho; grupo 3 irradiação em dois pontos (5 e 7,5cm da base cranial); grupo 4 foi irradiado em 3 pontos (2,5, 5 e 7,5cm da base do retalho); grupo 5 irradiação em 1 ponto à 2,5cm da base do retalho; grupo 6 irradiação em 2 pontos (2,5 e 5cm da base do retalho); grupo 7 irradiação em 1 ponto a 7,5 cm da base cranial. Os animais foram expostos à terapia *laser* com densidade de energia de 36J/cm² imediatamente após a cirurgia e uma vez ao dia por 4 dias subsequentes. Os resultados demonstraram que os animais do grupo 5 tiveram o maior aumento na viabilidade do retalho cutâneo, não havendo diferenças significantes entre outros grupos. O estudo concluiu que o laser de diodo foi eficaz na viabilidade do retalho cutâneo em ratos, e a aplicação da irradiação do *laser* em um ponto à 2,5cm da base cranial do retalho foi mais eficaz.

BOSSINI *et al.* (2009), estudaram os efeitos do *laser* Al-Ga-In-P (670nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico, em ratos. Foram utilizados 100 ratos distribuídos em cinco grupos de 20 animais cada: grupo 1 (controle), grupo 2 irradiado com $3\text{J}/\text{cm}^2$, grupo 3 irradiado com $6\text{J}/\text{cm}^2$, grupo 4 tratado com $12\text{J}/\text{cm}^2$, grupo 5 tratado com $24\text{J}/\text{cm}^2$. O *laser* foi irradiado imediatamente após a cirurgia e nos 4 dias subsequentes. No sétimo dia pós-operatório foi avaliada a porcentagem de necrose e foi coletado amostras de cada retalho para contagem de vasos sanguíneos. Como resultado, todos os animais dos grupos tratados com *laser* mostraram resultados significativos em relação ao grupo controle (necrose de 49.92%). A necrose dos grupos tratados foram, 41,82% (grupo 2), 36,51% (grupo 3), 29,45% (grupo 4) e 20,37% (grupo 5). Na contagem do número total de vasos sanguíneos, o grupo 1 mostrou média de 65,2 vasos; o grupo 2: 92,6; grupo 3: 105,5; grupo 4: 128,7 e grupo 5: 171,0. O estudo conclui que o *laser* com comprimento de onda de 670nm foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo, em todas as densidades de energias utilizadas, com uma tendência de melhores resultados com densidades de energias mais altas.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1- APROVAÇÃO DO PROJETO

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob o protocolo nº 1255/07 (Apêndice 1).

4.2- TIPO DE PESQUISA

Este é um estudo experimental, aleatorizado, intervencional, unicoego e controlado. Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

4.3- AMOSTRA

Para realização deste estudo foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus: albinus, Rodentia, Mammalia*), machos, adultos, com 8 semanas de idade e peso entre 260 e 300 gramas, da linhagem Wistar EPM

- 1, oriundos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP.

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais de polipropileno, durante 15 dias antes do início do experimento, recebendo ração e água *ad libitum* durante todo o período do trabalho, tendo ciclos de claro-escuro de 12 horas cada, com temperatura constante de 22°C, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatorizados pelo programa Bioestat 3.0, sendo distribuídos em três grupos, contendo 12 ratos cada, de acordo com os procedimentos operatórios e terapêuticos de cada grupo, como segue.

Grupo Controle: Os animais desse grupo foram submetidos à simulação da aplicação do *laser* de 660nm (Al-Ga-In-P) que ocorreu 30 segundos após o procedimento operatório e nos quatro dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia, sempre com o equipamento desligado. Utilizou-se a técnica pontual com contato com 24 pontos sobre o retalho e ao redor do mesmo, dispostos a 1cm da margem do retalho e com distância de 2cm entre os pontos.

Grupo 30mW: os animais desse grupo foram submetidos à irradiação *laser* 660nm (Al-Ga-In-P), com 30mW de potência e fluência de 3J/cm² com tempo de aplicação de 48s (Energia Total 1,44J), utilizando a técnica pontual com contato sobre e ao redor do retalho, com 24 pontos,

30s após o ato operatório e nos quatro dias subsequentes, totalizando 5 dias de tratamento.

Grupo 60mW: os animais de grupo foram submetidos à irradiação *laser* 660nm (Al-Ga-In-P), com 60mW de potência e fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$ com tempo de aplicação de 24s (Energia Total 1,44J), utilizando a técnica pontual com contato sobre e ao redor do retalho, com 24 pontos, 30s após o ato operatório e nos quatro dias subsequentes, totalizando 5 dias de tratamento.

Esses pontos de irradiação foram dispostos a 1cm da margem do retalho e a 2cm entre si previamente demarcados de acordo com a figura abaixo.

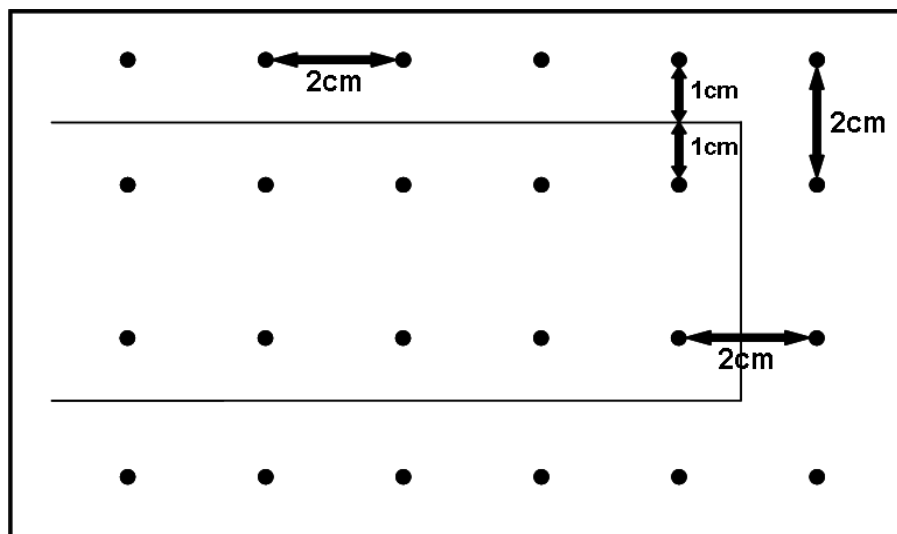


Figura 1 – Locais de irradiação do laser sobre e ao redor do retalho.

4.5- TÉCNICA OPERATÓRIA

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Ketamina (100mg/kg) associado a Cloridrato Xilazina (50mg/kg). Os animais foram retirados da gaiola, contidos pela região dorsal para aplicação via intramuscular, de anestésicos, no músculo gastrocnêmio direito. Para aplicação dos anestésicos, foi utilizada seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 45x13mm.

No plano anestésico os animais foram posicionados em decúbito ventral, sobre mesa operatória, para realização da epilação digital da região dorsal do animal em uma área de 6cm látero-lateral por 12cm crânio caudal, adotando como limite cranial a margem superior das escápulas e como limite caudal, 1cm abaixo das cristas ilíacas do animal.

Após a depilação digital, foi demarcado o campo operatório, em seguida realizado o retalho cutâneo randômico dorsal, de base cranial, com 10cm de comprimento e 4cm de largura (Figura 2). O retalho teve como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica. Todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador, que não teve conhecimento dos grupos os quais pertenciam os animais.

Ainda anestesiados, os animais foram preparados para o procedimento operatório, realizando anti-sepsia com composto iodado, de toda região dorsal e a pele foi incisada e descolada em todo o perímetro do retalho com auxílio de lâmina de bisturí número 15.

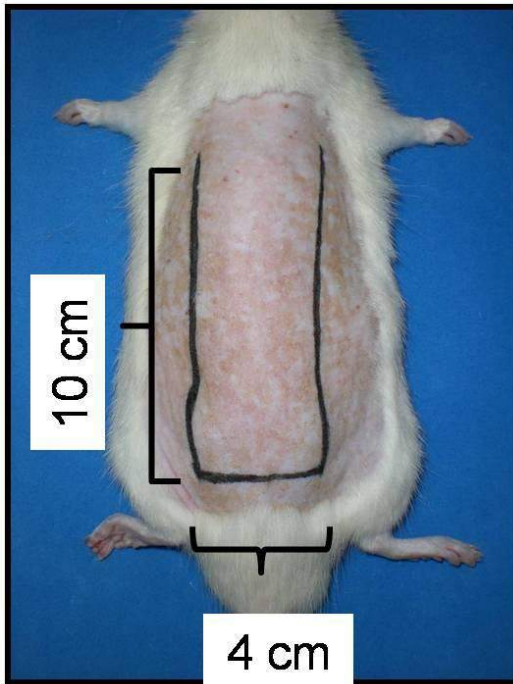


Figura 2- Animal depilado com as demarcações do retalho cutâneo randômico 10X4cm.

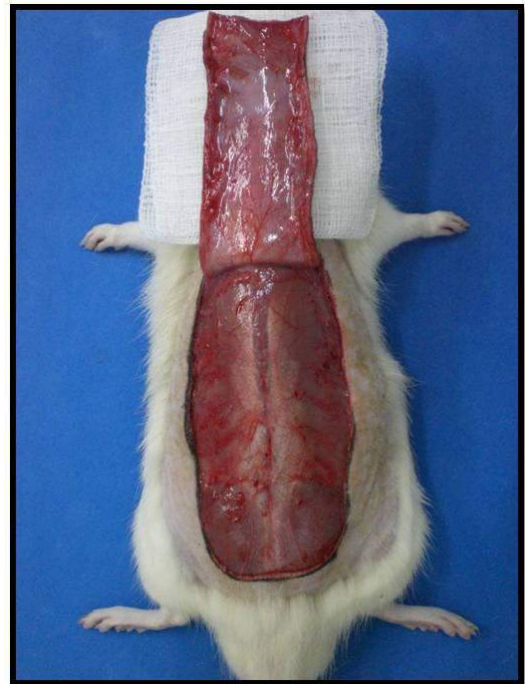


Figura 3- Elevação do retalho contendo pele e panículo carnoso.

Os retalhos foram elevados a partir da fáscia profunda dos músculos, englobando fáscia superficial, panículo carnoso e pele (Figura 3). Em seguida, foi interposta uma barreira plástica impermeável (filme F1-poliéster e polietileno), recortada nas medidas padrão (4cm x,10cm) entre o retalho e seu leito doador (Figura 4).

A sutura do retalho na posição inicial foi realizada com pontos simples de náilon monofilamentar 4-0, com intervalos de 1cm (Figura 5).

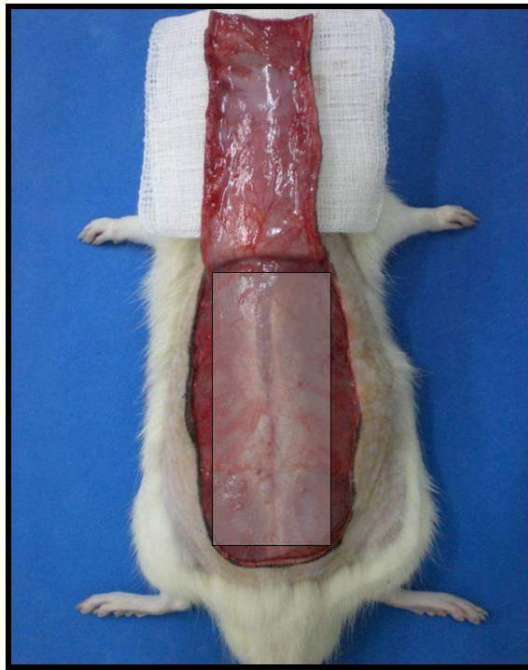


Figura 4- Interposição de uma barreira plástica de filme impermeável sobre o leito doador.

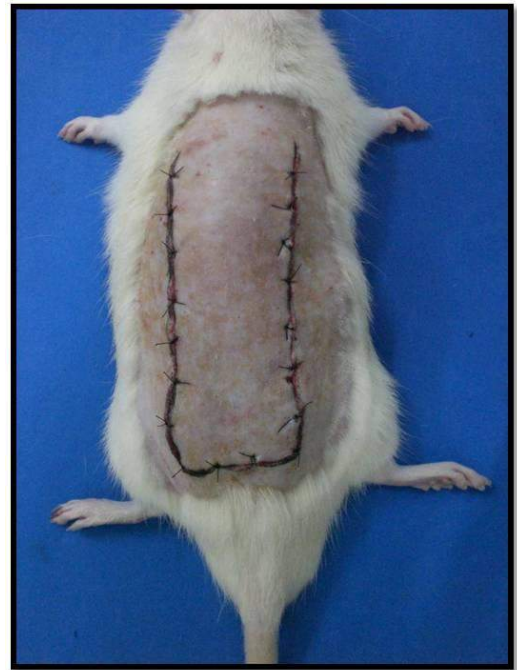


Figura 5- Sutura de toda extensão do retalho com pontos simples de náilon monofilamentar 4-0.

Após o procedimento operatório e, diariamente, até o dia da eutanásia, foi realizado método analgésico com 5 mg/kg de Cloridrato de Tramadol, por gavagem.

A documentação fotográfica dos animais foi realizada com etiqueta padronizada com o número do animal com a utilização da câmera digital Sony Cyber-shot (modelo DSC-s730).

Realizou-se a colocação de um colar cervical de material plástico para evitar a autofagia do ferimento. O colar foi fixado com 4 pontos de fio de náilon 0, nas posições superior, inferior, lateral direita e lateral esquerda.

Os animais foram recolocados em gaiolas individuais com ração e água à vontade.

4.6- EQUIPAMENTO E TÉCNICAS DE TRATAMENTO

Foi utilizado um aparelho emissor de radiação *laser* Thera Laser® da DMC Equipamentos Ltda., emitindo comprimento de onda de 660nm, Alumínio Gálio Índio Fósforo (Al-Ga-Inp), nas potências de 30 e 60mW, com área de secção transversal do feixe de 0,028cm² e com fibra óptica (Figura 6). Este aparelho foi calibrado em laboratório especializado antes e após o experimento, possuindo um dispositivo interno de auto calibração que era recrutado a cada aplicação, sendo utilizado em todas as aplicações.



Figura 6- Aparelho emissor de irradiação *Laser*

Na aplicação utilizou-se a técnica pontual com contato, mantendo a caneta do aparelho um ângulo de 90° com a pele. Foi utilizado molde plástico sobre o retalho em todos os grupos, com as demarcações dos pontos para que a irradiação fosse realizada sempre no mesmo local (ou sua simulação). (Figura 7)

Em todos os grupos, a partir do dia do procedimento (D0) até os quatro dias subseqüentes os animais foram anestesiados para aplicação do *laser*.

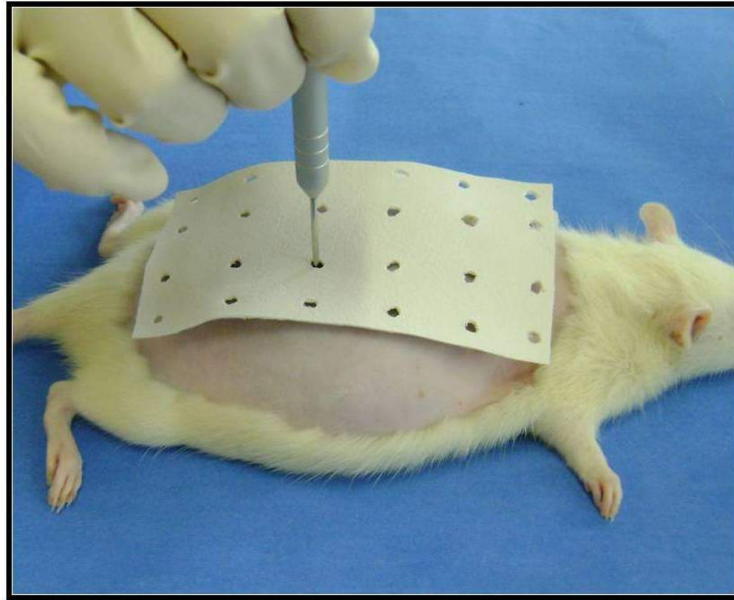


Figura 7. Aplicação do *Laser* com molde dos pontos de aplicação

4.7- ANÁLISES MACROSCÓPICAS DA ÁREA DE NECROSE

A análise macroscópica foi feita baseada no método sugerido por SANO K. *et al.* (2001) para quantificar a porcentagem macroscópica de necrose em retalho randômico, com a utilização de papel vegetal, grafite 2B e *Software* Adobe Photoshop CS/2®. Para esta mensuração, os animais foram anestesiados, no 7° dia pós-operatório, com a associação de 100mg/Kg de Cloridrato de Ketamina, com 50mg/Kg de Cloridrato de Xilazina.

Ao atingirem plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para sobrepor um corte de papel vegetal, com gramatura de 90g /95 metros quadrados (m²), medindo 6cm de largura por 12cm de

comprimento. Com a grafite 2B, os pesquisadores desenhavam todo o comprimento do retalho e em seguida a região do retalho onde houve necrose (figura 8). Esta avaliação foi realizada por dois pesquisadores que não sabiam as quais grupos os animais pertenciam.



Figura 8 – Demarcação do comprimento do retalho e da área de necrose.

O tecido viável foi determinado como sendo pele de cor rósea, macia, com pêlos e temperatura elevada. O tecido necrosado teve como parâmetros pele escurecida, rígida, sem pêlos e hipotérmica.

Os moldes desenhados em papel vegetal foram digitalizados em escâner, na resolução de 300 dpi. Com o *software* Adobe Photoshop foi

mensurada, em pixels, a área total do retalho e em seguida a área de necrose do retalho também em pixels (figura 9).

Para determinar a percentagem da área macroscópica de necrose de cada animal foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de Necrose} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pixels da área de necrose do retalho}}{\text{N}^\circ \text{ de pixels da área total do retalho}} \times 100$$

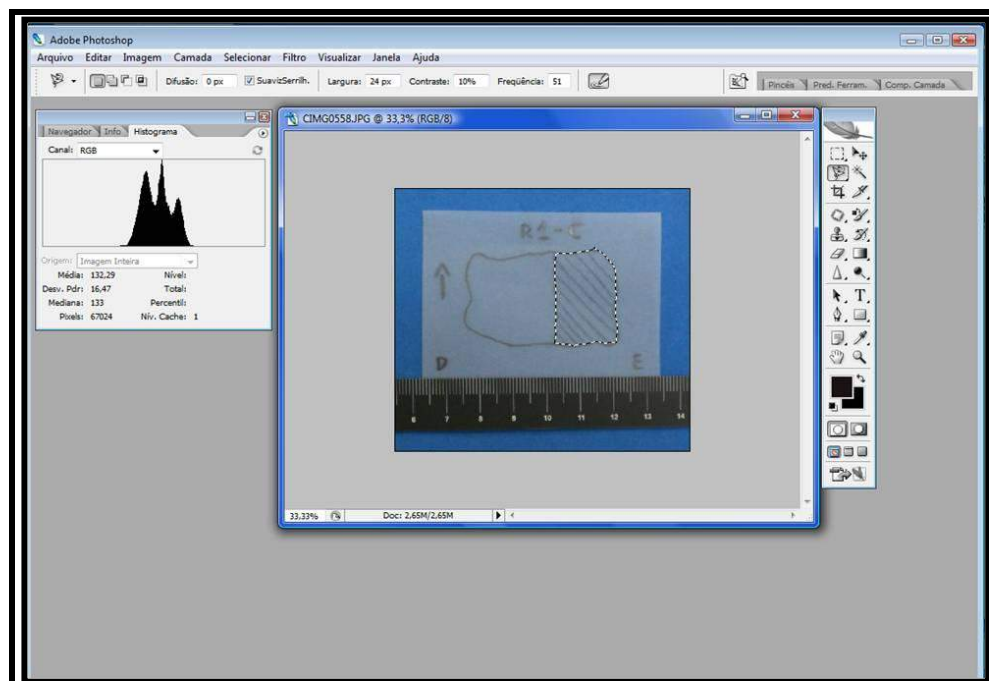


Figura 9- Mensuração em pixels da área total do retalho assim como da área da necrose no *software* Adobe Photoshop.

Os valores de área de necrose e de área total do retalho foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel 2007[®] para organização dos dados, formatação das tabelas e para análise estatística foi utilizado *software* BioEstat 4.0[®].

4.8- ANÁLISES MICROSCÓPICAS DE DENSIDADE VASCULAR

Ao final do 7º dia, os animais foram sacrificados por sobredose de anestésico (250mg/kg de Coridrato de Xilazina e 500mg/Kg de Cloridrato de Ketamina).

Após a eutanásia foi retirado todo o fragmento de pele referente às dimensões do retalho e o material foi fixado em solução de Formol a 4%, por 24 horas e encaminhado para processamento.

Posteriormente à fixação por 24 horas, as amostras de pele foram clivadas em cortes transversais divididos em fragmentos por toda a área viável do retalho. Foram selecionados 4 fragmentos para análise histológica, começando a seleção do primeiro corte (base cranial) até o último da área viável, sendo separado um fragmento a cada 5 cortes (Figura 10). Cada fragmento foi processado em banhos crescentes de álcool, seguidos pela clarificação em banhos de xilol, infiltrados em parafina a 60°C e posteriormente emblocados em parafina.

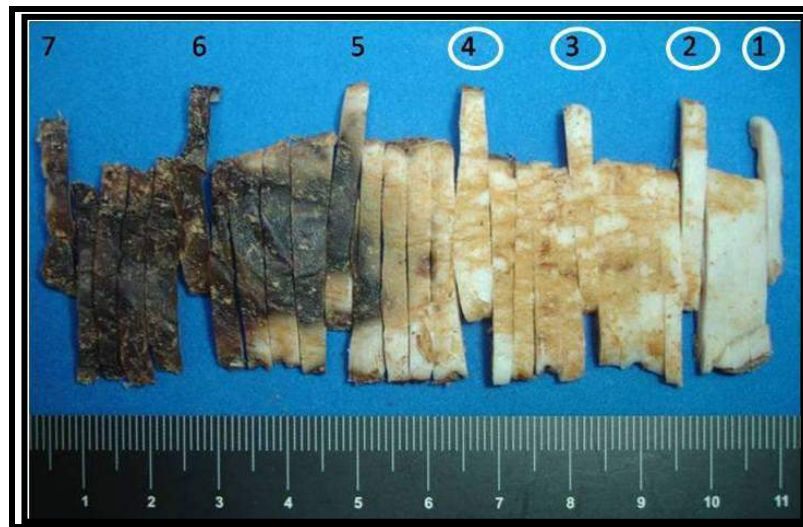


Figura 10- Seleção dos quatro fragmentos a partir da base cranial para análise microscópica.

Os blocos de parafina foram encaminhados para microtomia (micrótomo manual), onde foram realizados cortes histológicos de aproximadamente 4mm. Em seguida para coloração por Hematoxilina e Eosina, as lâminas, contendo os fragmentos de pele, foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água deionizada, corada em Hematoxilina de Mayer, seguida da coloração de Eosina-Floxina.

Depois de coradas, as lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula para serem analisadas.

Para mensuração da densidade vascular, foram realizadas as fotomicrografias das lâminas de cada fragmento selecionado em microscópio óptico marca Olympus BH-2 com câmera Sony acoplada, em uma lente ocular de 10x e objetiva de 40x totalizando um aumento de 400x.

Para a leitura morfométrica bidimensional foram observados 4 campos de cada fragmento selecionado, sendo 4 fragmentos de cada

animal, totalizando 16 campos por animal. Um gradeado, com 100 pontos foi sobreposto às fotomicrografias nos quais foram contados os vasos que coincidem com os pontos e o valor da densidade vascular expresso em porcentagem (Figura 11). Esta mensuração foi realizada por dois pesquisadores, que não tinham conhecimento de quais lâminas pertenciam aos animais de cada grupo.

Ao final da contagem dos vasos, de cada lâmina referente aos fragmentos selecionados, foi realizada a média aritmética do percentual de densidade vascular de cada animal e os valores foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel 2007® para organização dos dados, formatação das tabelas e envio para análise estatística.

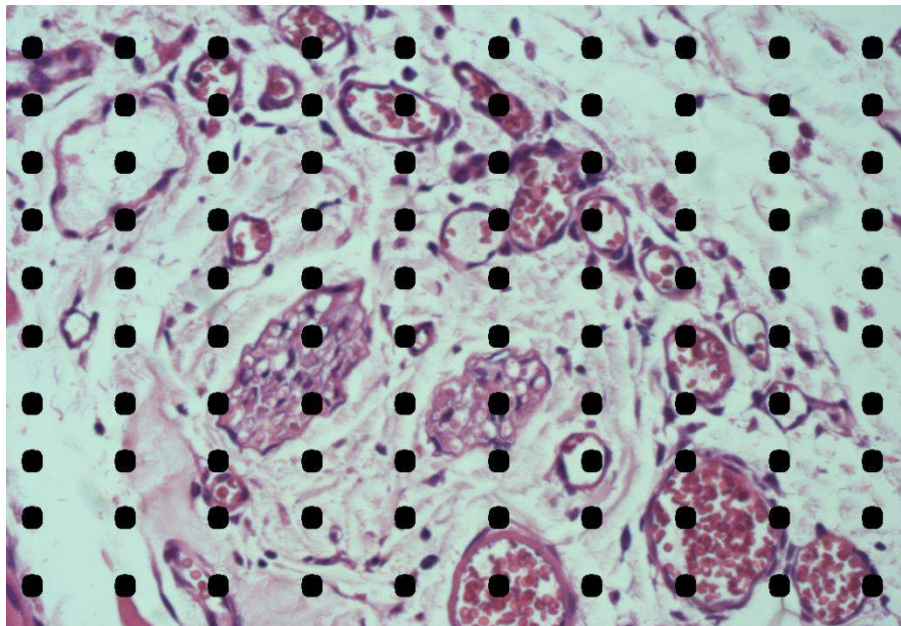


Figura 11- Gradeado, com 100 pontos sobreposto à fotomicrografia.

4.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foi utilizada concordância entre dois avaliadores, tanto para variável área de necrose como para variável densidade vascular e para calcular estas diferenças foi realizado o teste de Wilcoxon.

Para avaliar a diferença das porcentagens das variáveis área de necrose e densidade vascular, entre os grupos da pesquisa, foi utilizada a análise de variância de Kruskal Wallis.

Estabeleceu-se 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade e ao término do trabalho.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes entre as porcentagens de necrose entre os avaliadores foi aplicado o Teste de Wilcoxon, aos dados em questão.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05. (Tabela 1).

Tabela 1- Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal do avaliador 1 e avaliador 2 em relação ao grupo

COMPARAÇÃO ENTRE AVALIADORES - ÁREA DE NECROSE (%)						
Animal	Grupo Controle		Grupo 30		Grupo 60	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
R1	65	64	43	43	19	23
R2	54	50	14	16	13	16
R3	52	51	23	21	20	19
R4	51	49	28	28	2	2
R5	50	46	40	38	46	46
R6	51	50	16	17	39	36
R7	66	61	23	26	16	16
R8	53	52	5	6	6	6
R9	53	56	32	32	33	32
R10	60	58	29	31	41	39
R11	43	43	7	6	38	36
R12	37	43	25	21	21	20
Média	53	52	24	24	25	24
Mediana	52	51	24	23	21	21
Valor p	0.1823		0.9528		0.6241	

p > 0,05 (Teste Wilcoxon)

Com o intuito de verificar a existência ou não de diferenças significante entre as porcentagens de necrose entre os grupos, foi aplicada a análise de variância de Kruskal-Wallis.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Tabela 2- Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação ao grupo

COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS - ÁREA DE NECROSE (%)			
Animal	Grupo Controle	Grupo 30	Grupo 60
R1	65	43	19
R2	54	14	13
R3	52	23	20
R4	51	28	2
R5	50	40	46
R6	51	16	39
R7	66	23	16
R8	53	5	6
R9	53	32	33
R10	60	29	41
R11	43	7	38
R12	37	25	21
Média	53	24	25
Mediana	52	24	21
Desvio Padrão	8	12	15

GC > G30, G60 (p<0,05)

De acordo com a tabela 2, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as porcentagens de necrose, sendo que os valores mais elevados foram obtidos com o Grupo Controle (53%), que superaram os outros valores. Entre os grupos G30 e G60 não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Fig. 12).

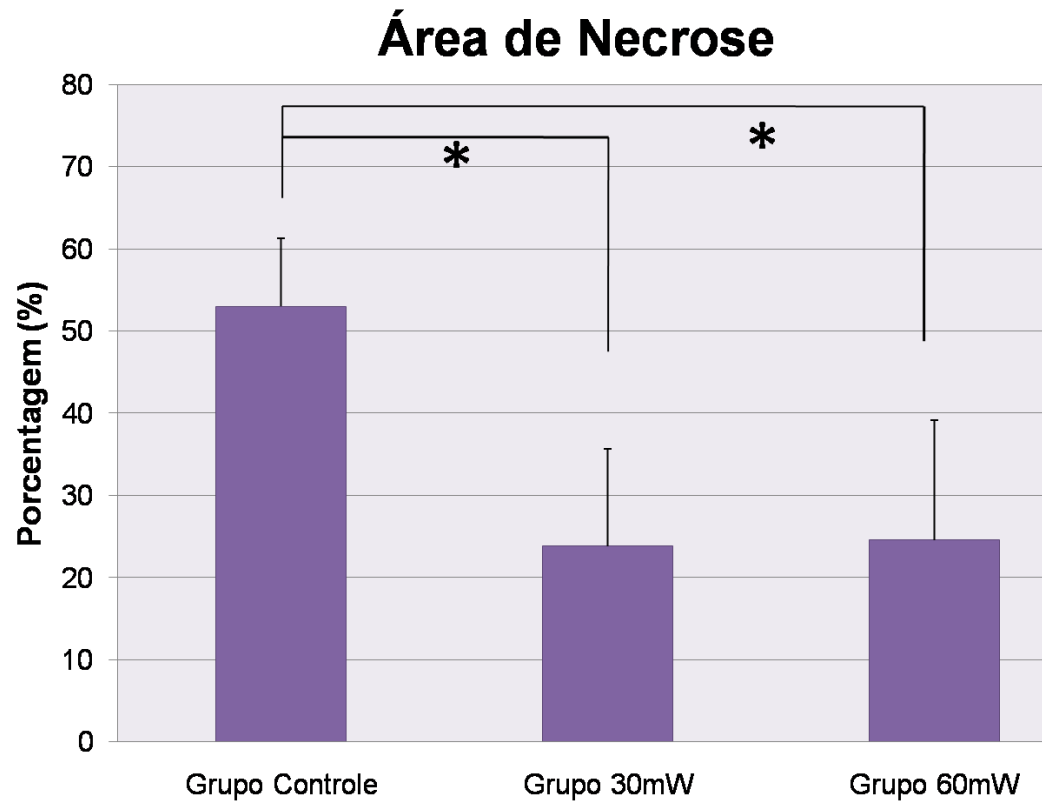


Figura 12- Médias das porcentagens de necrose tecidual do grupo controle, grupo 30mW e grupo 60mW. * A análise de variância de Kruskal-Wallis. GC - G30mW ($p < 0,05$); GC-G60mW ($p < 0,05$); G30mW- G60mW ($p > 0,05$)

Ao comparar a densidade vascular, entre os avaliadores, o teste de Wilcoxon evidenciou não haver diferenças estatisticamente significativas (Tabela 3). Sendo assim, foi utilizado os dados do avaliador 1.

Tabela 3- Comparação das porcentagens da densidade vascular de cada animal para avaliador 1 e avaliador 2.

COMPARAÇÃO ENTRE AVALIADORES - DENSIDADE VASCULAR (%)						
Animal	Grupo Controle		Grupo 30		Grupo 60	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
R1	43	42	57	56	56	58
R2	18	16	60	59	71	72
R3	35	34	66	66	42	40
R4	16	16	39	39	62	62
R5	20	20	38	37	42	43
R6	19	18	72	72	60	62
R7	32	30	50	50	69	70
R8	44	46	59	57	59	58
R9	50	50	67	68	86	86
R10	32	32	40	41	61	60
R11	87	86	61	61	46	46
R12	50	49	72	73	52	52
Média	37	37	57	57	59	59
Mediana	34	33	60	58	60	59
Valor p	0.1235		0.5541		0.4838	

$p > 0,05$ (Teste Wilcoxon)

A menor porcentagem da densidade vascular foi do grupo controle (37%), já o grupo 30mW apresentou uma maior porcentagem de densidade vascular (57%), superada pelo grupo 60mW (59%), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4- Comparação entre grupos em relação à densidade vascular.

COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS - DENSIDADE VASCULAR (%)			
Animal	Grupo Controle	Grupo 30	Grupo 60
R1	43	57	56
R2	18	60	71
R3	35	66	42
R4	16	39	62
R5	20	38	42
R6	19	72	60
R7	32	50	69
R8	44	59	59
R9	50	67	86
R10	32	40	61
R11	87	61	46
R12	50	72	52
Média	37	57	59
Mediana	34	60	60
Desvio Padrão	20	12	13

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa em relação à densidade vascular quando comparado o grupo controle com o grupo 30mW ($p < 0,05$), e o grupo controle com o grupo 60mW ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos experimentais com potência de 30mW e 60mW ($p > 0,05$). (Figura 13).

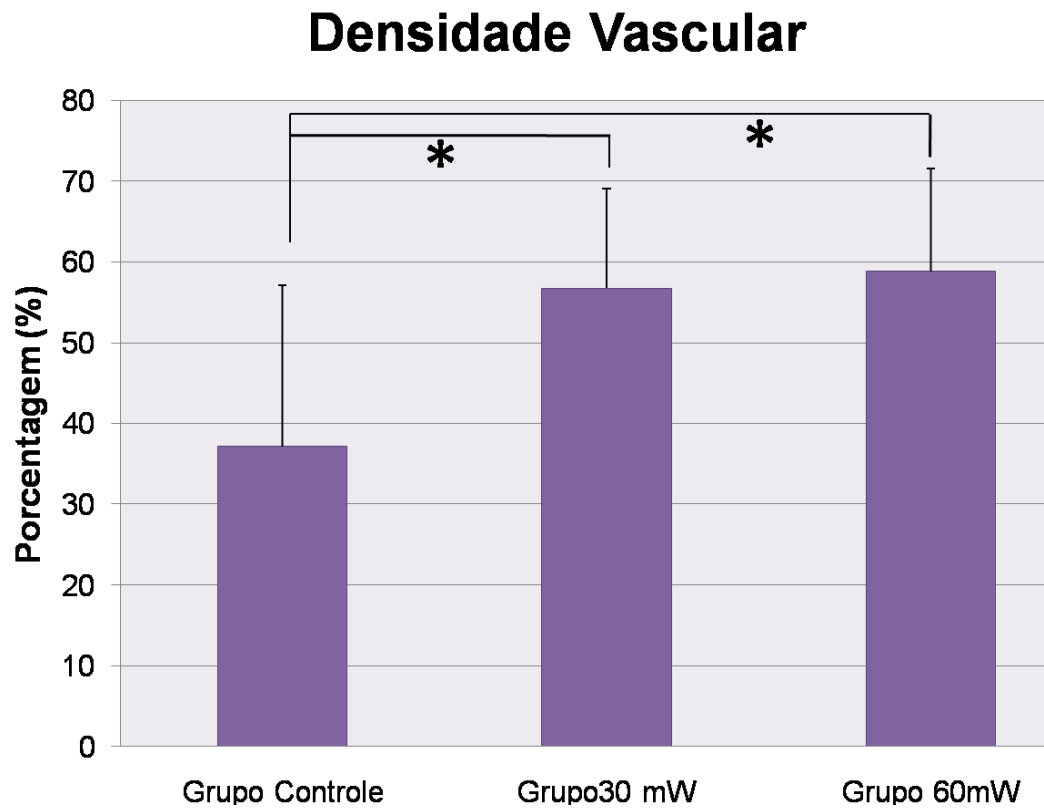


Figura 13- Médias das porcentagens de Densidade vascular do grupo controle; Grupo 30mW; Grupo 60mW. * A análise de variância de Kruskal-Wallis. GC - G30mW ($p < 0,05$); GC-G60mW ($p < 0,05$); G30mW- G60mW ($p > 0,05$)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O principal questionamento para realização do presente estudo foi devido à maioria dos trabalhos já realizados com *laser* na viabilidade de retalhos cutâneos, não levarem em consideração como foco principal, a influência da potência de saída do *laser* no processo de reparação tecidual.

A terapia *laser* de baixa intensidade em retalhos cutâneos e musculocutâneos vêm sendo utilizada para estudar os efeitos da irradiação *laser* na viabilidade da pele e a perfusão vascular da mesma. Nos estudos realizados, os autores encontraram resultados significativos em relação à diminuição da área de necrose por meio do aumento do fluxo sanguíneo e neoangiogênese. (KAMI *et al.* 1985; SMITH *et al.*, 1992; BISHT *et al.*, 1999; AMIR *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2003; PINFILDI *et al.*, 2008). Nesses e em outros estudos (KUBOTA & OSHIRO, 1996; ASSIS *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009) a seqüência de técnicas de aplicação pontual, pontual com contato e varredura, e parâmetros do *laser* como fluência, potência de saída e energia total são divergentes, mesmo tendo resultados significativos. Somente SMITH *et al.* (1992) não mostraram resultados significantes em relação à área de necrose com a técnica de varredura. Isso foi devido à baixa energia entregue ao tecido ($0,082\text{J}/\text{cm}^2$) ao utilizar a técnica empregada (varredura). Os demais estudos (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009) tiveram

resultados significantes tanto com a técnica pontual sem contato como a pontual com contato.

Com intuito de estudar as fluências (doses), diversos foram os valores utilizados nos estudos, variando de $0,082\text{J}/\text{cm}^2$ (SMITH *et al.*, 1992) a $185\text{J}/\text{cm}^2$ (KUBOTA, 2002), tendo $3\text{J}/\text{cm}^2$ a fluência que mais se repete (PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009), onde todos os valores utilizados tiveram resultados significantes. Sendo que alguns estudos como BOSSINI *et al.* 2009 verificaram diferentes fluências no mesmo estudo. No presente estudo foi utilizada a fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$ por ser um parâmetro base que demonstrou resultados significativos em estudos anteriores.

Na tentativa de comparar os tipos de *lasers*, os comprimentos de onda (λ) utilizados nos estudos variou de 632,8nm (SMITH *et al.*, 1992; PINFILDI *et al.*, 2005) à 904nm (ASSIS *et al.*, 2005). Variando assim entre *laser* de luz vermelha visível e *laser* infravermelho. A maioria dos estudos utilizou o *laser* vermelho visível, como no presente estudo (SMITH *et al.* 1992; AMIR *et al.* 2000; PINFILDI *et al.* 2005; ASSIS *et al.* 2005; BOSSINI *et al.*, 2009).

Em relação à potência, nos estudos realizados com *laser* em retalho cutâneo randômico, esta variou de 0,2mW (ZHANG *et al.*, 1992) à 100mW (KUBOTA, 2002), onde o parâmetro mais utilizado foi a potência de 30mW. Porém, essas potências foram utilizadas individualmente em cada estudo. Já o presente estudo teve como objetivo comparar duas potências 30mW (mais utilizada) e 60mW (parâmetro considerado elevado para o *laser* vermelho visível, o qual foi utilizado nesse estudo) partindo do questionamento de qual seria a influência desse parâmetro no aumento do

aporte sanguíneo no retalho cutâneo, uma vez que este ainda não foi investigado.

Em relação à energia total que foi utilizada em cada sessão de tratamento, os estudos trazem uma grande diversidade de valores, o que se esperava já que todos outros parâmetros apresentam a mesma diversidade, porém em quase todos os trabalhos foram encontrados resultados significantes da aplicação do *laser* na viabilidade dos retalhos (SMITH *et al.* 1992; AMIR *et al.* 2000; PINFILDI *et al.* 2005; ASSIS *et al.* 2005; BOSSINI *et al.*, 2009).

As evidências científicas e clínicas ainda não são suficientes e, às vezes, contraditórias, justificando a necessidade e a importância da realização de pesquisas envolvendo o *laser* terapêutico.

Neste estudo foi utilizado o rato como animal de experimentação, devido ao modelo de retalho randômico escolhido, facilidade de obtenção do animal, baixo custo e manuseio laboratorial. Assim como o grande número de trabalhos existentes na literatura que utilizam esse modelo animal, facilitando a comparação entre os resultados obtidos. (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA; OSHIRO, 1996; KUBOTA, 2002; LIEBANO; FERREIRA; NETO, 2002; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; LIEBANO; ABLA; FERREIRA, 2008; BOSSINI *et al.*, 2009).

Diversos estudos nessa mesma área foram realizados com animais pela necessidade de retirar amostras teciduais que são fundamentais para ao avanço das pesquisas (SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005).

Para analisar a necrose, utilizou-se o retalho cutâneo randômico como modelo experimental, proposto por MCFARLANE, DE YOUNG, HENRY (1965), que é uma das formas de se estudar a viabilidade dos tecidos e perfusão vascular. Esse modelo, geralmente apresenta porcentagem de necrose entre 25% a 50% a partir de sua porção distal, apesar de que em 5,7% dos casos não ocorre necrose significativa.

Com o intuito de padronizar as condições de isquemia e de necrose, foi interposto um filme plástico entre o retalho e o leito doador, para impedir a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito, conforme descrito em alguns estudos. (KAUFMAN *et al.*, 1985; DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009).

No presente estudo, a radiação *laser* foi aplicada em 24 pontos, distribuídos sobre e ao redor do retalho, baseando-se no trabalho de PINFILDI *et al.* (2005) que encontraram a menor área de necrose quando se aplicou o *laser* sobre e ao redor do retalho cutâneo randômico com *laser* de 632,8nm (He-Ne) e obteve 22,61% de área de necrose comparado a 48,86% do grupo controle o que demonstrou aumento da viabilidade do mesmo em ratos.

PRADO *et al.* (2005) também estudaram a técnica de aplicação com somente 1 ponto na base cranial do retalho cutâneo, porém com *laser* com comprimento de onda de 830nm (AsGaAl) e encontraram resultados também significantes em relação a diminuição da necrose tecidual. PINFILDI *et al.* (2008) relata que em retalhos cutâneos randômicos, que não possuem uma artéria específica seria interessante irradiar ao redor do mesmo. Porém estudos como o de PRADO *et al.* (2008) demonstraram que

pode apresentar resultados significantes irradiando a base cranial do retalho (de onde se originam os vasos e não sofrem secção) com valores de necroses menores comparado a estudos que utilizaram 24 pontos (BOSSINI *et al.* 2009).

A técnica de aplicação empregada neste estudo foi a pontual com contato, de acordo com estudos realizados por KAMI *et al.* (1985), AMIR *et al.* (2000), PINFILDI *et al.* (2005), ASSIS *et al.* (2005) e BOSSINI (2009). A aplicação da fonte do *laser* em contato com a superfície da pele durante a irradiação, segundo alguns autores (GREATHOUSE, CURRIER, GILMORE, 1985; LAAKSO, RICHARDSON, CRAMOND, 1993; BAXTER, 1991), aumenta a profundidade de penetração devido à redução da reflexão e dispersão de energia. Outros trabalhos que utilizaram o mesmo tipo de técnica, também demonstraram resultados significativos em relação ao aumento da viabilidade em retalhos e em úlceras, tanto em ratos quanto em seres humanos (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; KUBOTA & OSHIRO, 1996; SCHINDL *et al.*, 1999; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009).

Os grupos experimentais do presente estudo foram irradiados durante 5 dias consecutivos, sendo imediatamente após a operação e nos 4 dias seguintes, assim como PINFILDI *et al.* (2005), ASSIS *et al.* (2005) e BOSSINI *et al.* (2009), que obtiveram resultados significantes quanto ao aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico.

No presente estudo as avaliações macroscópicas de necrose e microscópicas de densidade vascular foram realizadas no 7º dia pós-operatório devido aos sinais de necrose do retalho serem evidentes entre o terceiro e quarto dia, sendo seu limiar final de necrose entre 7 a 10 dias (MCFARLANE, DE YOUNG, HENRY, 1965; KAMI *et al.*, 1985;

DUARTE *et al.*, 1998). Diferentemente dos trabalhos realizados por SMITH *et al.* (1992) e KUBOTA & OSHIRO (1996) onde os retalhos foram avaliados no 5º dia pós-operatório. Devido essa divergência entre dias de avaliação, estudos futuros serão realizados para verificar se realmente há essa diferença. Diferentemente também de HARDER *et al.* (2004) que descreveram em um estudo sobre a evolução do tecido isquêmico que no 7º dia pós-operatório em ratos não se observou mais sinais de neovascularização quando não utiliza nenhum tipo de terapia.

Para quantificação macroscópica da eficácia dos métodos empregados com finalidades terapêuticas, SASAKI & PANG (1980), descreveram um método para avaliar a necrose tecidual de retalhos cutâneos randômicos, utilizando papel vegetal, grafite e balança de precisão. A vantagem desse método está na facilidade de utilização e custo, devido à vasta utilização na literatura, mostrando ser um método eficaz e confiável (LIEBANO *et al.*, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005). SANO *et al.* (2001), utilizaram método semelhante para avaliação de retalho *TRAM*, utilizando o gabarito de papel associado a um programa computadorizado. O gabarito de papel é escaneado eletronicamente e salvo em bitmap (bmp) para posterior análise da área de necrose com o *software* Adobe Photoshop 6.0. A utilização de um método computadorizado evita alguns pequenos erros no momento da demarcação dos limites do retalho, porém esses autores discutem que mesmo esses pequenos erros não fazem diferença no momento da aferição. O presente estudo escolheu esse método de avaliação pela facilidade e nível de confiabilidade no programa utilizado.

No sétimo dia pós-operatório foi realizada a coleta dos retalhos cutâneos de todos os animais com o objetivo de quantificar a densidade

vascular a partir dos vasos sanguíneos presentes nas amostras a fim de fornecer dados adicionais a respeito da viabilidade dos retalhos. Para isto, foi utilizado o método morfométrico bidimensional para quantificar a densidade vascular, onde demonstrou eficácia na representação do aumento do número de vasos nos retalhos. Esse método foi utilizado por BARTHE *et al* (1991) na análise da vascularização de pele de retalhos em coelhos. VÖLKER W *et al.* (2008), utilizaram a análise morfométrica nas fibras colágenas em peles de pacientes com dissecação espontânea da artéria cervical e CHERETIS *et al.* (2008) utilizaram a morfometria para detectar a recidiva de célula de carcinoma basal.

Para a coleta da amostra, foram escolhidos 4 fragmentos, que foram selecionados para análise histológica, começando a seleção do primeiro corte até o último sendo separado um fragmento a cada 5 cortes. Essa forma de padronização da coleta foi utilizada com o propósito de realizar a contagem dos vasos da amostra, conforme a área viável do retalho nos diferentes grupos. Diferente de BOSSINI *et al.* (2009), que realizou contagem do número total de vasos, retirando uma amostra de 2cm² da linha de transição da região de necrose e área viável de cada retalho cutâneo, sendo diferente do presente estudo que objetivou realizar a densidade vascular de toda a base cranial do retalho utilizando 4 fragmentos dessa área de cada retalho.

No presente estudo, os valores de porcentagem de necrose do grupo controle (GC) variaram entre 43% e 66%, com média de 53%. No grupo 30mW, em que os animais foram submetidos à irradiação *laser* com potência de 30mW, as áreas de necrose variaram entre 5% e 43%, com média de 24%. ASSIS *et al.* (2005) ao utilizarem potência de 30mW com um *laser* vermelho visível ($\lambda=670\text{nm}$) e fluência de 16J/cm², obtiveram

27% de necrose do retalho cutâneo, sendo seu melhor resultado em relação ao grupo controle (48%). Observa-se que o parâmetro que coincide com o presente estudo é apenas a potência (30mW).

PRADO *et al.*(2005) também utilizaram uma potência de 30mW, porém com um laser infravermelho ($\lambda= 830\text{nm}$) irradiando uma fluência de $36\text{J}/\text{cm}^2$ obtendo uma porcentagem de necrose de 23,14%, sendo este o resultado mais significativo quando comparado ao seu grupo controle (48,86%). Estes resultados são próximos ao do presente estudo, mesmo com um *laser* infravermelho. BOSSINI *et al.* (2009) ao comparar quatro diferentes fluências, também com potência de 30mW, em um dos grupos irradiou $3\text{J}/\text{cm}^2$ com um *laser* visível (670nm) e obteve resultado significativo no aumento da viabilidade dos retalhos, assim como o presente estudo.

Outro fator determinante para a aplicação da energia foi a fluência utilizada. PINFILDI *et al.* (2005) também utilizou uma fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$, porém com potência de 10mW de um *laser* vermelho visível (632,8nm) e teve como resultado 22,61% de necrose nos retalhos que foram irradiados. Resultado semelhante ao obtido pelo nosso estudo.

No grupo 60mW desse estudo, onde os animais receberam a irradiação *laser* com potência de 60mW, as áreas de necrose variaram entre 6% a 46%, com média de 25%. KUBOTA & OSHIRO (1996) ao utilizar um *laser* (830nm) com potência de 60 mW e fluência de $36\text{J}/\text{cm}^2$, observaram os efeitos da radiação *laser* por meio da fluxometria por *laser* Doppler, avaliando a microcirculação no retalho irradiado e a viabilidade do retalho. A área de necrose do retalho cutâneo do grupo irradiado (32,1%) foi significativamente maior em relação ao grupo controle (39,2%). Esses resultados corroboram com o presente estudo quanto ao aumento

significante na perfusão vascular após a utilização do *laser* de 60mW, porém o comprimento de onda e a fluência foram diferentes entre os estudos.

Quanto à densidade vascular do presente estudo, o grupo controle variou de 16% e 87%, com média 37%. No grupo 30mW a densidade vascular variou de 38% e 72%, com média de 57%. E no grupo 60mW variaram entre 42% e 86%, com média de 59%. A avaliação da densidade vascular foi realizada com o intuito de pesquisar a angiogênese nos retalhos.

BOSSINI *et al.* (2009), avaliaram a viabilidade do retalho randômico cutâneo, porém através da contagem do número total de vasos sanguíneos, onde seu grupo controle mostrou média de 65,2 vasos; o grupo 2: 92,6 (fluência de 3J/cm² e potência de 30mW). Este estudo realizou a contagem total de vasos de um fragmento de cada retalho. Já o presente estudo avaliou a densidade vascular de 4 fragmentos de cada retalho, não sendo possível a comparação entre os valores. Porém ambos os estudos chegaram à mesma conclusão de que o *laser* foi eficaz no aumento do número de vasos.

O resultado do presente estudo, em comparação com os demais em retalhos cutâneos, mostra a diversidade de padronização quanto aos parâmetros do *laser*. Principalmente quanto à potência, parâmetro escolhido pelo presente estudo para investigação e que não foram encontrados estudos com o mesmo objetivo.

Os resultados mostraram lacunas importantes quanto à necrose tecidual. Como perspectivas serão interessantes estudos com óxido nítrico (NO) associado às alterações celulares com VEGF, cálcio intracelular relacionando apoptose celular e outros fatores de crescimento associados

aos fibroblastos que fazem parte do complexo ciclo angiogênese e necrose tecidual.

Mais pesquisas são necessárias com o objetivo de esclarecer dúvidas relacionadas aos parâmetros da terapia a *laser* de baixa intensidade como fluência, comprimento de onda, potência e técnica de aplicação, que são importantes fontes de pesquisas e de divergência entre os estudos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O *Laser* de Baixa Intensidade foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico, não havendo diferenças nas potências utilizadas.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Lopes AL, Rigau J, Zângaro RA, Neto GJ, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2): 179-84.

Amir A, Solomon AS, Giler S, Cordoba M, Hauben DJ. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* 2000; 53(1): 58-62.

Assis LR, Marcolino A, Pinfildi CE, Prado RP. Comparison of the 904nm and 670nm diode laser in the viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(1):118-9.

Barthe GP, Suarez NC, Ortega JMR. Morphological changes in the vascularisation of delayed flaps in rabbits. *Br J Plast Surg.* 1991; 44(4):285-90.

Basford JR. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995; 16(5): 331-42.

Baxter GD, Bell AJ, Allen JM, Ravey J. Low level laser therapy: Current clinical practice in Northern Ireland. *Physiother.* 1991;77:171-8.

Bisht D, Mehrotra R, Singh PA, Atri SC, Kumar A. Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37(2): 187-9.

Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(2):209-13.

Cheretis C, Angelidou E, Dietrich F, Politi E, Kiaris H, Koutselini H. Prognostic value of computer-assisted morphological and morphometrical analysis for detecting the recurrence tendency of basal cell carcinoma. *Med Sci Monit.* 2008;14(5): 13-9.

Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg.* 1999; 1: 27-32.

Duarte SI, Gomes HFC, Ferreira LM. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. *Can J Plast Surg.* 1998; 6(2): 93-7.

Esteves Júnior I, Masson IB, Ferreira LM, Liebano RE, Baldan C, Gomes AC. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir. Bras.* 2005; 20(2):164-7.

Ferreira LM, Andrews JM, Filho JL, Ramos RR. Retalho fáscio-cutâneo axial na reparação de perdas de substâncias da perna. *F Med.* 1986; 93(4):261-4.

Ferreira LM, Andrews JM, Filho JL. Retalho fasciocutâneo de base distal: Estudo anatômico e aplicação clínica nas lesões do terço inferior da perna. *Rev Bras de Ort.* 1987; 2(5): 127-31.

Ferreira LM, Andrews JM, Filho JL. Homologus transplantation of a limb (compound tissue): perspective for the future. *Rev Assoc Med Bras.* 1995; 41(2): 151-7.

Ferreira LM, Nicoletti SJ, Hochman BS, Filho LJ, Andrews JM. Utilização da fixação de Hoffman em retalho fáscio-cutâneo Cross-leg. *F Med.* 1988; 97(2): 95-7.

Greathouse DG, Currier DP, Gilmore RL. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. *Phys Ther.* 1985; 65(8): 1184-7.

Guerardini G, Lundeberg T, Cui J, Eriksson SV, Trubek S, Linderoth B. Spinal cord stimulation improves survival in ischemic skin flaps: an experimental study of the possible mediation by calcitonin gene-related peptide. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103(4): 1221-8.

Harder Y, Amon M, Erni D, Menger MD. Evolution of Ischemic Tissue Injury in a Random Pattern Flap: A New Mouse Model Using Intravital Microscopy. *J Surg Res.* 2004; 121(2):197–205.

Im MJ, Lee WP, Hoopes JE. Effect of electrical stimulation on survival of skin flaps in pigs. *Phys Ther.* 1990; 70(1): 37-40.

Jansen G, Lundeberg T, Samuelson UE, Thomas M. Increased survival of ischemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. *Acta Physiol Scand.* 1989; 135(4):555-8.

Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Ohshiro T, Fujino T. Effects of Low-Power Diode Lasers on Flap Survival. *Ann Plast Surg.* 1985; 14(3): 278-83.

Kaufman T, Angel MF, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz DJ, Futrell JW. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. *Ann Plast Surg.* 1985; 14(1): 64-73.

Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 1983; 72(6): 766-77.

Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. *Physioterapy.* 1991;77:161-8.

Kitchen SS. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 3ª ed. São Paulo: Manole; 2003.

Kjartansson J, Lundeberg T. Effects of electrical nerve stimulation (TENS) in ischemic tissue. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1990; 24(2):129-34.

Kubota J, Oshiro T. The effects of diode laser LLLT on flap survival: measurement of flap microcirculation with laser speckle flowmetry. *Laser Ther.* 1996; 8: 241-6.

Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci.* 2002; 17 (3): 146-53.

Laakso L, Richardson C, Cramond T. Factors affecting low level laser therapy. *Australian J Physiother.* 1993; 39(2):87-92.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *ASPS/PSEF/ASMS 70th Annual Scientific Meeting.* Orlando, Flórida. November 3-7, 2001.

Liebano RE, Ferreira LM, Neto MS. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on the viability of random skin flap in rats. *Can J Plast Surg.* 2002; 10(4): 151-4.

Liebano RE, Abla LE, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on the viability of ischemic skin flaps in the rat. A amplitude study. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(1): 65-9.

Low J, Reed A. *Eletroterapia Explicada: princípios e prática.* 3ª ed. São Paulo: Manole; 2001.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Laser Surg Med.* 1985; 5(1): 31-9.

McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* 1965; 35: 177-82.

NiinaY, Ikeda K, Iwa M, Sakita M. Effects of electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of musculocutaneous flap in rats. *Am J Chin Med.* 1997; 25(3): 273-80.

Ohshiro T, Fujino T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. *Keio J Med.* 1993; 42(4): 191-5.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman B, Ferreira LM.. Helium-neon Laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med.* 2005;37(1):74-7.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MM, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect Low- Level Laser Therapy on Mast Cells in viability of the Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap. *Photomed Laser Surg.* 2008 Sep 11. Epub ahead of print.

Prado RP; Ferreira LM, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE. Diode Laser in viability of random skin flap in rats. 5th Congress of the World Association for Laser Therapy (WALT). *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):89-115.

Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira, LM. Effect of Application Site of Low-Level Laser Therapy in Random Cutaneous Flap Viability in Rats. *Photomed Laser Surg.* 2008. [Epub ahead of print].

Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003; 33(5): 344-51.

Salmi A.M, Hong C, Futrell J.W. – Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischemic preconditioning: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1999; 33(2): 163-7.

Sano K, Hallock GG, Wasser TE, Robson PA, Rice DC. Comparison of a new method for computer analysis with standard techniques for measuring survival rates in the rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Ann Plast Surg.* 2001. 47 (6): 647-51.

Santos VNS, Ferreira LM, Horibe EK, Duarte IS. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. *Acta Cir Bras.* 2004. 19(5):466-70.

Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flap in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65(2): 152-8.

Schindl A, Schindl M, Schindl L, Jureka W, Honigsmann H, Breier F. Increased dermal angiogenesis after low intensity laser therapy for chronic radiation ulcer determined by a Video measuring system. *J Am Acad Dermatol.* 1999; 40(3): 481-4.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-Intensity Laser Therapy: A Review. *J Inv Medicine.* 2000; 48(5): 312-26.

Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of Low-Energy Laser on Skin-Flap Survival in the Rat and Porcine Animal Models. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89(2): 306-10.

Korlof B, Ugland O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with Coplamin and with Dicoumarol: animal experiments. *Acta Chir Scand.* 1966; 131: 408-12.

Völker W, Ringelstein EB, Dittrich R, Maintz D, Nassenstein I, Heindel W, Grewe S, Kuhlenbäumer G. Morphometric analysis of collagen fibrils in skin of patients with spontaneous cervical artery dissection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79(2): 1007-12.

Webb C, Dyson M, Lewis WH. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg Med.* 1998; 22:294-301.

Zhang D, Zhout Y, Xiao B, Li G. The effect of postoperative irradiation with low incident levels of CO₂ laser irradiation on skin flap survival and the possible mechanisms. *Laser Ther.* 1992;75-9.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

- DeCS Descritores em Ciências da Saúde [base de dados na Internet]. São Paulo: BIREME; [citado 2005 Nov 17]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

- Ferreira LM. Manual de cirurgia plástica. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 1995. Capítulo 20, Retalhos Cutâneos; p.545-62.

- Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica – UNIFESP. 2008

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

- C.O.B.E.A. (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) - Princípios éticos da experimentação animal (no caso do uso dos mesmos). Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

- National Library Medicine. List of journals indexed for MEDLINE [monograph on the Internet]. Washington: National Library of Medicine; 2005 Jun [cited 2005 Nov 1]. Available from: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

- Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole Ltda.; 2001.248p.

- INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE - Nomina anatômica veterinária. 3.ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

- Pellizzon RF, Población DA, Goldenberg S. Pesquisa na área da saúde: seleção das principais fontes para acesso à literatura científica. Acta Cir Bras. 2003;18(6):493-6.


ABSTRACT

Background and Objectives: Potency values in low level laser therapy (LLLT) are not well defined. This present study was designed to assess the effects of LLLT with output power of 30 and 60mW, in the viability of a random skin flap in rats. **Methods:** Thirty six wistar rats were randomly divided in three groups: control (CG), was not irradiated; 30 mW potency (30mW) and 60 mW potency (60mW). In both treated groups a fluency of $3\text{J}/\text{cm}^2$ was used. Two minutes after elevation of a random pattern, cranially based, dorsal flap (4 x 10 cm), laser irradiation was applied and repeated on the first, second, third and fourth postoperative days. Percentages of flap necrosis were calculated on the seventh postoperative day. Also, four fragments of each flap were collected in order to allow determination of the percentages of vascular density, according to bidimensional method the blood vessels morphometric analysis. Statistical analysis included Wilcoxon's test and Kruskal Wallis' variance analysis. A significance level of 5 % was elected ($p \leq 0.005$). **Results:** Laser treated animals presented significantly less necrosis than control rats (CG = 53 % x 30G = 24 %; $p < 0.05$) (CG x 60G = 25 %; $p < 0.05$). No difference was found between laser treated animals. Also, laser treated animals presented significantly more vascular density than control rats (CG = 37 % x 30G = 57 %; $p < 0.05$) (CG x 60G = 59 %; $p < 0.05$). No difference was found between laser treated animals. **Conclusion:** Low level laser with potency of 30 and 60mW, increased the viability of a random skin flap in rats.

Key words: Low Level Laser therapy; Microcirculation; Necrosis; Surgical flaps; Physiotherapy.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Aceite do Comitê de ética em Pesquisa.

	Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina	Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo
---	--	---

São Paulo, 6 de setembro de 2007
CEP 1255/07

Ilmo(a). Sr(a).
 Pesquisador(a) **MAIRA SILVA DA COSTA**
 Co-Investigadores: Carlos Eduardo pinfidi, Heitor Gomes e Lydia Massako Ferreira
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
 Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Influência da densidade de potência do laser de baixa intensidade na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos”.**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA D - ESTUDO CRÔNICO.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar a influência da densidade de potência do Laser de baixa intensidade, na viabilidade de retalho cutâneo, randômico, no rato..

RESUMO: Trata-se de trabalho experimental onde serão utilizados 45 ratos Wistar com 3 meses de idade provenientes do CEDEME. Os procedimentos experimentais serão conduzidos no Biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Será utilizado aparelho emissor de Laser, emitindo comprimento de onda de 685 nm. Os animais serão divididos em : **GRUPO CONTROLE** : simulação da irradiação do laser de 685 nm, porém com o equipamento desligado; **GRUPO 30-3** - irradiação laser 685nm com 30mW utilizando a técnica pontual como contato sobre e ao redor do retalho, com 24 pontos, 30 segundos após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes; **GRUPO 60-3** : irradiação laser 685nm com 60mW utilizando a técnica pontual como contato sobre e ao redor do retalho, com 24 pontos, 30 segundos após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. Em todos os grupos a aplicação do laser será em 24 pontos, distribuídos a 1 cm do retalho e a 2 cm entre si. A anestesia utilizado para o ato cirúrgico será cloridrato de tiletamina e zolazepan IP. A eutanásia será por overdose de anestésico..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo bem fundamentado. O retalho cutâneo é procedimento cirúrgico muito frequente em cirurgia plástica e sua mais temível complicação é a isquemia. Vários recursos têm sido tentados para aumentar a viabilidade do retalho e dentre eles, o laser de baixa intensidade é uma alternativa de tratamento..

MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: PROJETO SEM FINANCIAMENTO ESPECÍFICO.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **5/9/2008 e 5/9/2009.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

APÊNDICE 2- Protocolo de procedimento operatório, avaliação e tratamento.

Rato	Cirurgia + 1° dia Laser	2° dia Laser	3° dia Laser	4° dia Laser	5° dia Laser	7° dia % necrose + Vasos
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

32						
33						
34						
35						
36						

APÊNDICE 3- Fotomicrografias dos Grupos Controle, 30mW e 60mW, respectivamente.

