

**MICHELE AKEMI NISHIOKA**

**TERAPIA A *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE  
E DIODO EMISSOR DE LUZ NA VIABILIDADE  
DE RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO EM  
RATOS**

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

**SÃO PAULO**

**2010**

**MICHELE AKEMI NISHIOKA**

**TERAPIA A *LASER* DE BAIXA INTENSIDADE  
E DIODO EMISSOR DE LUZ NA VIABILIDADE  
DE RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO EM  
RATOS**

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

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. LYDIA MASAHO FERREIRA**

**CO-ORIENTADORES: Prof. HEITOR CARVALHO GOMES**

**Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI**

**SÃO PAULO**

**2010**

Nishioka, Michele Akemi.

**Terapia a *Laser* de baixa intensidade e diodo emissor de luz na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos./** Michele Akemi

Nishioka. -- São Paulo, 2010.

XVI,101f

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Low level laser therapy and light emitting diode in viability of random skin flaps in rats.

1.Terapia a Laser de baixa intensidade. 2.Fototerapia. 3.Retalhos cirúrgicos. 4.Necrose. 5.Vasos Sanguíneos. 6.Mastócitos. 7.Ratos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA PLÁSTICA**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, Massayuki e Setumi, que são meus exemplos de vida e que me proporcionaram todo o alicerce emocional e intelectual, além disso, são os principais autores para o estímulo profissional. Minhas palavras tornam-se incapazes de registrar o amor que sinto por vocês. Aos meus queridos irmãos Marcelo e Marcos, os quais são meus eternos amigos, por me ajudar a manter intacto meu alicerce emocional, mesmo com muita saudade de casa. A toda minha família, incluindo minhas tias, tios e cunhada pelo apoio, encorajamento, amor e compreensão ao longo de todos os momentos desta trajetória. Que mesmo com a distância durante esse tempo, são as fontes de toda força e vontade para a concretização deste estudo.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo - 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 todo o estudo, com diversas críticas construtivas para a melhora da tese, além de servir como exemplo de liderança e conhecimento. Fico extremamente grata pelo conhecimento concedido durante toda essa trajetória, tal qual será guardado e lembrado sempre.

Ao Prof. **HEITOR CARVALHO GOMES**, Professor Co-orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter contribuído na elaboração deste estudo, pelas instruções e questionamentos no desenvolvimento e término deste estudo.

Ao Prof. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, professor adjunto do curso de fisioterapia da UNIFESP Campus Baixada Santista e Professor Co-orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelo grande amigo que é, por ter me auxiliado ao longo de todo este estudo, incluindo diversas correções e alterações no corpo da tese,

além de ser um dos principais autores do encorajamento no caminho científico desde a graduação, e no caminho acadêmico desde o Aperfeiçoamento em Cirurgia Plástica da UNIFESP até a conclusão deste estudo. Fico imensamente grata pelos conhecimentos concedidos ao longo da minha carreira profissional, pela oportunidade de conviver ao lado de um professor que é um exemplo a todos os fisioterapeutas devido a sua trajetória profissional impecável, e pelos conselhos, tanto profissionais quanto pessoais ao longo de todos esses anos que nos conhecemos.

Ao Prof. **VICTOR EDUARDO ARRUIA ARIAS**, Professor do Departamento de Patologia da UNIFESP, por toda colaboração, empenho e aprendizado concedido na análise das lâminas. Sou muito grata pela disponibilidade e paciência durante todas as fases deste estudo.

Ao Prof. **BERNARDO HOCHMAN**, professor afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica e orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter concedido a oportunidade de acompanhar o ambulatório de Cicatrizes Patológicas da UNIFESP, o qual obtive muito conhecimento e experiência, além disso, por sempre ter me encorajado cada vez mais na carreira acadêmica, a qual, fez parte diretamente devido aos ensinamentos concedidos durante a formulação de diversos projetos realizados. Fico imensamente grata pela oportunidade de

conviver ao lado de um professor que, além de ser um exemplo de profissional é também um exemplo de pessoa humana, verdadeira e amiga.

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 e que me ajudaram durante a estada no Aperfeiçoamento e Mestrado em Cirurgia Plástica da UNIFESP.

A meu grande amigo **RAFAEL GOBBATO**, aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, que foi presente em todas as etapas da pesquisa, desde a etapa experimental à formatação da tese escrita e apresentação oral.

Aos amigos **ÂNGELA FERREIRA, FABIANNE FURTADO, MARCO NEVES, MAÍRA COSTA, PASCALE TACANI, TIAGO SILVEIRA, SORAIA FERRARA, VIVIANE WOOD**, ex-alunos do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelas correções e questionamentos feitos na tese escrita e, sobretudo, na apresentação oral.

A todos os **AMIGOS e AMIGAS** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela colaboração e críticas sobre o conteúdo e formatação da tese, principalmente ao **GERALDO SALOMÉ**



e **SILVANA GAIBA**, pelas correções realizadas na pré-defesa, as quais ajudaram imensamente na finalização do corpo da tese.

Às minhas amigas do Curso de Pesquisa Científica em Cirurgia da UNIFESP, **ARAINY SUELYN ANTUNES**, **PAOLA MONTEIRO**, **TATIANA SHELIGA**, por terem me ajudado nas correções do corpo da tese, além disso, foram de extrema importância no auxílio da fase experimental. Fico grata pelo carinho e dedicação durante todo esse tempo.

À minha amiga e estatística, **MELISSA POLLILO**, por ter me auxiliado durante todo esse trajeto, com sua imensa paciência em demonstrar, ensinar e explicar todos os dados dos resultados deste estudo, além de ter realizado diversas correções no corpo da tese.

A todos os **PROFESSORES ORIENTADORES** e **COLABORADORES** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelas críticas sempre construtivas ajudando na melhora e finalização deste estudo, sendo assim, foram fundamentais para realização desta etapa e ainda continuarão essenciais nas próximas etapas.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.” (Albert Einstein)

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.OBJETIVO .....</b>	<b>6</b>
<b>3.LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
<b>4.MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>8.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>84</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>88</b>

## Lista de Figuras

Figura 1.	Organograma ilustrando a distribuição dos grupos.....	26
Figura 2.	Animal demarcado com as medidas-padrão do retalho cutâneo randômico 10x4cm.....	28
Figura 3.	Retalho elevado contendo pele e panículo carnosos.....	28
Figura 4.	Interposição de uma barreira plástica de filme impermeável sobre o leito doador.....	29
Figura 5.	Sutura de toda extensão do retalho com pontos simples de náilon monofilamentar 4-0.....	29
Figura 6.	Equipamento <i>Laser</i> de baixa intensidade 660nm (AlGaInP).....	30
Figura 7.	Equipamento de <i>LED</i> 630nm (AlGaInP).....	30
Figura 8.	Gabarito plástico para aplicação do <i>laser</i> a 2,5cm da base cranial e a 2,0cm equidistantes das margens laterais do retalho.....	32
Figura 9.	Gabarito plástico para aplicação do <i>LED</i> a 2,5cm da base cranial e a 2,0cm equidistantes das margens laterais do retalho.....	32
Figura 10.	Amostras de pele (A e B) retiradas para as avaliações de densidade vascular e exocitose de mastócitos.....	33
Figura 11.	Gabarito de papel, com as demarcações da área total do retalho e do limite entre tecido viável e tecido necrosado...	34
Figura 12.	Molde digitalizado para mensuração da área total e da área de necrose em pixels pelo Adobe Photoshop.....	35
Figura 13.	Distribuição dos valores da porcentagem de necrose dos grupos.....	41
Figura 14.	Distribuição dos valores de densidade vascular da amostra A.....	43
Figura 15.	Distribuição dos valores médios de densidade vascular da amostra B.....	45
Figura 16.	A: Lâmina de Hematoxilina/Eosina da amostra A, com aumento de 400x com as setas indicando os vasos sanguíneos. B: Lâmina de Hematoxilina/Eosina da	46

	amostra B, com aumento de 400x.....	
Figura 17.	Distribuição dos valores da exocitose de mastócitos da amostra A.....	47
Figura 18.	Distribuição dos valores da exocitose de mastócitos da amostra B.....	49
Figura 19.	A: Lâmina de Azul de Toluidina da amostra A, com aumento de 400x com as setas indicando mastócitos. B: Lâmina de Azul de Toluidina da amostra B, com aumento de 400x com as setas indicando mastócitos.....	50

## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação aos grupos.....	40
Tabela 2.	Comparação entre grupos em relação à densidade vascular da amostra A.....	42
Tabela 3.	Comparação entre grupos em relação à densidade vascular da amostra B.....	44
Tabela 4.	Comparação entre Amostras A e B em relação à densidade vascular.....	45
Tabela 5.	Comparação entre grupos em relação aos mastócitos da amostra A.....	47
Tabela 6.	Comparação entre grupos em relação aos mastócitos da amostra B.....	48
Tabela 7.	Comparação entre Amostras A e B em relação aos mastócitos.....	49

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AlGaInP	Alumínio gálio índio fósforo
ANOVA	Análise de variância
AsGaAl	Arseneto de gálio e alumínio
bmp	Bitmap
°C	Graus Celsius
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
$\lambda$	Comprimento de onda
DE	Densidade de energia
E	Energia total
et al	E colaboradores
GaAlAs	Gálio alumínio arsenieto
g	Gramas
°	Graus
G1	Grupo um
G2	Grupo dois
G3	Grupo três
G4	Grupo quarto
HeNe	Hélio-neônio
J/cm <sup>2</sup>	Joules por centímetro quadrado
J	Joules
Kg	Kilograma

LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> - amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LED	<i>Light Emitting Diode</i> - Diodo Emissor de Luz
MDA	Malondialdeído
m <sup>2</sup>	Metros quadrados
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma de massa corporal
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
n	Número da amostra
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
P	Potência útil
R	Rato
s	Segundo
s/cm <sup>2</sup>	Segundo por centímetros quadrado
TRAM	<i>Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous</i> - Retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watt



## RESUMO

**Introdução:** O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico frequente na cirurgia plástica, tem como principal complicação a formação de necrose. Desta maneira, diversos estudos utilizaram o *laser* de baixa intensidade para aumentar a viabilidade de retalhos. Atualmente, os diodos emissores de luz tem sido introduzidos, como alternativa da luz *laser*. **Objetivo:** Avaliar o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade e diodo emissor de luz na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 48 animais distribuídos em 4 grupos; em todos os animais foi realizado o retalho cutâneo randômico: grupo 1 simulação; grupo 2 radiação *laser* 660nm, com densidade de energia 5J/cm<sup>2</sup>; grupo 3 radiação *LED* 630nm, 5J/cm<sup>2</sup> e grupo 4 radiação *laser* 660nm, 89J/cm<sup>2</sup>. A irradiação foi realizada após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho. No 7º dia pós-operatório, foi avaliada a densidade vascular, número de mastócitos e porcentagem de área de necrose. **Resultados:** A porcentagem de necrose foi significativamente menor no grupo 3 (14,08%) e no grupo 4 (14,03%) em relação ao grupo 1 (28,70%) e ao grupo 2 (22,7%) com p<0,05. Na densidade vascular e número de mastócitos, somente os animais do grupo 3 apresentaram aumento significativo em relação ao grupo 1 (p<0,05). **Conclusão:** A terapia a *laser* de baixa intensidade e diodo emissor de luz com as mesmas energias totais foram eficientes no aumento da viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico amplamente utilizado na cirurgia plástica, sobretudo na reparadora, sendo essencial para a reconstrução funcional e estética de falhas congênitas, traumáticas ou de origem neoplásicas (KORLOF & UGLAND, 1966; FERREIRA *et al.*, 1986; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1987; IM, LEE, HOOPEs, 1990; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1995). Após a realização do retalho cutâneo, uma das principais complicações é a necrose tecidual, devido à isquemia e ao escasso suprimento sanguíneo ao longo do retalho, o que leva a falha do tratamento proposto, sendo necessárias novas intervenções cirúrgicas, ocasionando um aumento do período de internação dos pacientes (KERRIGAN, 1983; KJARTANSSON & LUNDEBERG, 1990; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; GHERARDINI *et al.* 1999; SALMI, HONG, FUTRELL, 1999; FREIRE *et al.*, 2003).

As causas das complicações do retalho podem ser atribuídas a fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os extrínsecos, incluem-se condições sistêmicas (infecção, inflamação, arteriosclerose, hipotensão e desnutrição) e condições locais (compressão, tensão, trombos ou torção no pedículo) (KERRIGAN, 1983; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1995; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005). Um dos fatores intrínsecos mais estudados, é a insuficiência arterial do retalho, que pode estar relacionada à secção de vasos cutâneos e terminais nervosos simpáticos pela elevação do

retalho, provocando a diminuição do fluxo sanguíneo ao longo do mesmo (KERRIGAN, 1983; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005).

Assim, diversos estudos foram realizados com o intuito de melhorar o fluxo sanguíneo em retalhos, diminuindo as condições de isquemia e minimizando a formação de necrose ( KERRIGAN, 1983; FERREIRA *et al.*, 1986; SAGI *et al.*, 1986; FERREIRA *et al.*, 1988; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; GHERARDINI *et al.*, 1999; SALMI, HONG, FUTRELL, 1999). Com este intuito, foram utilizados diversos agentes físicos, como a acupuntura e a eletroacupuntura (JANSEN *et al.*, 1989; NIINA *et al.*, 1997), energia eletromagnética pulsada (KRAG *et al.*, 1979), correntes elétricas de baixa frequência polarizadas (KJARTANSSON *et al.*, 1988; IM, LEE, HOOPEES, 1990), correntes não polarizadas (LUNDEBERG, KJARTANSSON, SAMUELSSON, 1988; KJARTANSSON & LUNDEBERG, 1990; LIEBANO, FERREIRA, SABINO, 2002; SANTOS *et al.*, 2004) e o *laser* de baixa intensidade (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; ASSIS *et al.*, 2006; PINFILDI *et al.* 2005; PRADO *et al.* 2005; BOSSINI *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.* 2009; CURY *et al.* 2009; COSTA *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2010).

A terapia a *laser* de baixa intensidade vem mostrando resultados significantes no aumento do fluxo sanguíneo, neoangiogênese e conseqüentemente, diminuição da área de necrose em retalhos cutâneos em estudos experimentais (KAMI *et al.*, 1985; MESTER, MESTER, MESTER, 1985; OHSHIRO & FUJINO, 1993; STRANC, 1998; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005;

BOSSINI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; CURY *et al.* 2009; COSTA *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2010).

No entanto, há uma discrepância na literatura em relação aos parâmetros do *laser* de baixa intensidade, como comprimento de onda, área de secção transversal do feixe e densidade de energia (BASFORD, 1995; SCHINDL *et al.*, 2000; ALMEIDA-LOPES *et al.* 2001; REDDY, 2003; EELLS *et al.*, 2004). Além destas características, atualmente, há divergências quanto às variáveis da luz, como coerência e colimação. Isso vem ocorrendo devido à introdução de alguns estudos utilizando o diodo emissor de luz (*Light emitting diode - LED*), como alternativa da luz *laser* (AL-WATBAN & ANDRES, 2003; WHELAN *et al.*, 2003; CORAZZA *et al.*, 2007).

Desse modo, a luz *LED* ou terapia com *LED* de baixa intensidade vem tornando-se uma alternativa promissora em relação à luz *laser*, pois ambas produzem uma faixa espectral relativamente estreita, com o *LED* tendo o espectro mais largo, produzindo feixes de luz sem colimação e sem coerência (AL-WATBAN & ANDRES, 2003; WHELAN *et al.*, 2003; CORAZZA *et al.*, 2007). Estudos utilizando o *LED* apresentaram resultados positivos na aceleração do processo cicatricial (VINCK *et al.*, 2003; AL-WATBAN & ANDRES, 2003; WHELAN *et al.*, 2003; TRELLES, ALLONES, MAYO, 2006; CORAZZA *et al.*, 2007), além de atuar de modo eficiente em outras condições fisiológicas e patológicas (WONG-RILEY *et al.*, 2001; WEISS *et al.*, 2005).

CORAZZA *et al.* (2007) estudaram a influência da luz *LED* com comprimento de onda de 630nm e o *laser* com comprimento de onda de 660nm, ambos com densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup> e 20J/cm<sup>2</sup>, em feridas cutâneas induzidas mecanicamente em ratos, verificando os efeitos

angiogênicos nas fases de reparação tecidual (3°, 7°, 14°, 21° dias). Tanto o *LED* como o *laser* com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  obtiveram melhores resultados. Entretanto, alguns estudos afirmam a ineficiência dessa fonte de luz sem coerência (BIHARI & MESTER, 1989; BERTOLONI *et al.*, 1993; PONTINEN *et al.*, 1996).

Assim, na literatura pesquisada não foram encontrados estudos que utilizassem o *LED* na viabilidade de retalhos isquêmicos, tornando-se necessária a realização de estudos para avaliar os resultados entre os tipos de tratamentos propostos.

**OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade e diodo emissor de luz na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.



**LITERATURA**

### 3. LITERATURA

McFARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965), realizaram modelo experimental para estudo e prevenção da necrose de retalho cutâneo randômico em ratos Sprague-Dawley. A demarcação do retalho foi realizada por meio de molde plástico, tendo como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, medindo 10cm de comprimento e 4cm de largura, com proporção entre comprimento e largura de 2,5:1. O retalho era elevado a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo fáscia superficial, panículo carnosos e pele. Foi observado necrose do retalho em 94,3% dos animais.

KERRIGAN (1983) realizou estudo experimental para investigar o mecanismo fisiopatológico da necrose do retalho em porcos, por meio de microesferas radioativas. A necrose do retalho poderia ocorrer por meio de fatores extrínsecos sistêmicos, como infecção, arteriosclerose, hipotensão, má nutrição e fatores locais, como compressão, tensão ou trombose anastomótica do pedículo. O principal fator intrínseco descrito foi a insuficiência arterial do retalho. A fisiopatologia seria explicada pelo seccionamento dos vasos cutâneos e terminais nervosos simpáticos, provocando uma diminuição do fluxo sanguíneo no sentido caudal ao longo do retalho. A importância de modalidades de tratamento que aumentem o fluxo arterial para o retalho ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos, foi evidenciada.

KAMI *et al.* (1985) investigaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalho cutâneo de base caudal (9x3cm), em ratos. Foram utilizados 60 animais, distribuídos em 3 grupos: Grupo controle; Grupo 1 (irradiado no pré-operatório) e Grupo 2 (irradiado no pós-operatório), ambos foram irradiados durante 5 dias consecutivos. Foi utilizado o *laser* de diodo de Arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl) de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 830nm, área de secção transversal do feixe de 0,02cm<sup>2</sup>, potência de 15mW, densidade de energia de 16J/cm<sup>2</sup>, durante 20 segundos por ponto, no modo contínuo, em 18 pontos horizontais, igualmente distribuídos ao longo do retalho. As áreas de viabilidade dos retalhos foram mensuradas e comparadas 7 dias após o ato operatório, sendo 46,1% no grupo controle; 52,5% no de radiação pré-operatória e 53,5% no de radiação pós-operatória. Neste estudo foi obtido aumento significativo da área de viabilidade do retalho em ambos os grupos que receberam radiação *laser* em relação ao controle, porém, não houve diferença significativa entre eles. Segundo os autores, o aumento da viabilidade do retalho ocorreu devido à proliferação de vasos sanguíneos observados ao redor dos pontos irradiados, bem como um aumento no fluxo sanguíneo.

SMITH *et al.* (1992) realizaram um estudo para observar os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalhos de base caudal (2x7cm) em 20 ratos, e de base medial (2x7cm) em 5 porcos. Os ratos foram distribuídos em 2 grupos de 10 cada, sendo, grupo controle e grupo experimental. Neste grupo, foi utilizado o *laser* hélio-neônio (HeNe) de baixa intensidade com a técnica de varredura, com comprimento de onda

de 632,8nm, área de secção transversal do feixe de  $0,008\text{cm}^2$ , potência de 5mW, densidade de energia de  $0,082\text{J}/\text{cm}^2$ , durante  $30\text{s}/\text{cm}^2$ , por 10 dias (4 dias pré-operatórios, 10 minutos antes da elevação do retalho e 5 dias pós-operatórios). Nos porcos, foram realizados 40 retalhos cutâneos de base medial ( $2\times 7\text{cm}$ ), sendo 4 de cada lado do animal, utilizando o lado contralateral, como controle para radiação *laser*, onde o delineamento experimental foi similar ao empregado em ratos. No 5º dia pós-operatório, foi realizada avaliação da área de necrose, e não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental em ambos os modelos animais.

KUBOTA & OHSHIRO (1996) avaliaram a microcirculação e a viabilidade do tecido após radiação *laser* de baixa intensidade em retalho cutâneo de base caudal ( $9\times 3\text{cm}$ ), por meio de fluxometria por *Laser Doppler*. Vinte ratos foram distribuídos em 2 grupos de 10 animais cada, sendo um grupo controle e um grupo com radiação *laser* diodo de AsGaAl de baixa intensidade com a técnica pontual a 1cm de distância do tecido, com comprimento de onda de 830nm, área de secção transversal do feixe de  $0,1\text{cm}^2$ , potência de 60mW, densidade de energia de  $36\text{J}/\text{cm}^2$ , por 1 minuto, em 1 ponto no centro da base do retalho, localizado a 2cm, em sentido distal, da base caudal do retalho. Todos os animais foram submetidos à avaliação do *Laser Doppler* antes da radiação, imediatamente após radiação e 30 minutos após radiação. No grupo controle, houve diferença significativa na avaliação imediatamente após a radiação e 30 minutos após a radiação, com diminuição da perfusão microvascular. No grupo irradiado, houve diferença somente na avaliação 30 minutos após a

radiação, mostrando aumento significativo da perfusão. Após 5 dias do ato operatório, foram avaliadas as porcentagens da área de viabilidade do retalho cutâneo, e o grupo irradiado (67,9%) obteve porcentagem de área viável significativamente maior comparado com grupo controle (60,8%).

AMIR *et al.* (2000) investigaram os efeitos da radiação *laser* de baixa intensidade em retalhos cutâneos (8x2,5cm) em ratos. Foram utilizados 30 animais, distribuídos em 3 grupos: grupo 1 (controle); grupo 2 irradiado em 1 ponto na zona de transição (3,5 a 5,5cm da base do retalho); grupo 3 irradiado em 2 pontos, na mesma zona de transição e na porção distal do retalho (5,5 a 7,5cm da base do retalho), ambos durante 5 dias consecutivos após o ato operatório. Foi utilizado o *laser* de HeNe de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 632,8nm, área de secção transversa do feixe de 3,14cm<sup>2</sup>, potência de 6mW, e densidade de energia de 2,9J/cm<sup>2</sup> em cada ponto. Após 10 dias da última irradiação, a análise macroscópica mostrou efeitos benéficos em ambos os grupos irradiados, o grupo 2 apresentou média de 60% de tecido viável e o grupo 3, de 61,8%. A análise histológica mostrou aumento na proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos nos grupos irradiados, e o grupo 3 apresentou número de vasos sanguíneos significativamente maior que o grupo 2. Segundo os autores, o aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos em ambos os grupos irradiados, pode ser resultado de diversos mecanismos de ação do *laser* e, sobretudo pela neovascularização.

SANO *et al.* (2001) observaram diversos métodos para mensuração da área de viabilidade dos retalhos em modelos animais, como planimetria, programas de computador e o método gabarito de papel. Assim sendo, o estudo comparou a validade de dois métodos: gabarito de papel e programa de computador (*Adobe Photoshop*). Foram utilizados 64 ratos Sprague-Dawley distribuídos em 6 grupos, de acordo com diferentes técnicas de retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome (TRAM) utilizadas. Todos os gabaritos de papel foram escaneados eletronicamente em forma de bitmap (bmp), e cada bmp foi colorido correspondendo às áreas viável e não viável dos retalhos, utilizando o *software* mais comum para esse tipo de avaliação. Assim, a soma dos pixels individuais coloridos foram somados para calcular a porcentagem da área de viabilidade dos retalhos. A comparação entre os métodos de avaliação em 64 retalhos TRAM mostrou que a área viável foi ligeiramente maior quando utilizado o método do *software*, porém, sem diferença significativa quando comparado com o método de gabarito de papel ( $p=0,479$ ). Em conclusão, os autores verificaram que tanto o método de gabarito de papel como o *software* do programa de computador são confiáveis para avaliar a viabilidade do TRAM.

KUBOTA (2002) investigou os efeitos do *laser* de baixa intensidade no fluxo sanguíneo e na viabilidade do retalho cutâneo axial de base caudal (3x9cm) em ratos. Foram utilizados 40 animais distribuídos em 4 grupos: grupo 1 (controle); grupo 2 (irradiação sobre artéria iliolumbar); grupo 3 (irradiação na metade proximal do retalho) e grupo 4 (irradiação na metade distal do retalho). Foi utilizado *laser* diodo de AsGaAl de baixa intensidade

com a técnica pontual, com comprimento de onda de 830nm, área de secção transversal do feixe de  $0,0054\text{cm}^2$ , potência de 100mW e densidade de energia de  $185\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 10 segundos. O fluxo sanguíneo foi avaliado, mediante fluxometria por *Laser Doppler* durante a radiação *laser* e, novamente, nos 5º e 10º minutos após a irradiação, neste momento, o retalho foi suturado na sua posição de origem. Foi demonstrado aumento significativo no fluxo sanguíneo, no 5º e 10º minuto pós-irradiação nos grupos experimentais em relação ao controle. Após 5 dias do ato operatório, foi observada diferença significativa na área de viabilidade do retalho em todos os grupos em relação ao controle, porém, não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Segundo o autor, essa melhora no fluxo sanguíneo e na área de viabilidade seria devido ao possível mecanismo de modulação do sistema nervoso autônomo. Para o autor, a terapia a *laser* aumentou o fluxo sanguíneo e a perfusão de retalhos, sendo estes efeitos importantes na viabilidade de retalhos.

PINFILDI *et al.* (2005) avaliaram a eficácia do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. Neste estudo, todos os animais foram submetidos ao retalho cutâneo randômico (10x4cm), sendo utilizada uma barreira plástica interposta entre o retalho e seu leito. Os 48 animais foram distribuídos em 4 grupos de 12 animais cada, sendo grupo 1 (controle); grupo 2 (irradiação *laser* sobre o retalho em 27 pontos); grupo 3 (irradiação *laser* ao redor do retalho em 27 pontos) e grupo 4 (irradiação *laser* sobre e ao redor do retalho em 54 pontos). Foi utilizado *laser* de HeNe de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 632,8nm, área de secção transversal

do feixe de  $0,1\text{cm}^2$ , potência de  $10\text{mW}$ , e densidade de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , a irradiação iniciou-se imediatamente, após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. No 7º dia após o ato operatório, foram avaliadas as porcentagens de área de necrose com o método de gabarito de papel, e as médias de área de necrose foram: grupo 1 (48,86%), grupo 2 (38,67%), grupo 3 (35,34%) e grupo 4 (22,61%). Assim, todos os grupos experimentais obtiveram resultados significantes em relação ao grupo controle, porém, o grupo 4 obteve melhores resultados em relação aos demais ( $p < 0,001$ ). Em conclusão, a radiação *laser* HeNe de baixa intensidade foi eficiente no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, e a irradiação aplicada sobre e ao redor do retalho foi a mais eficaz.

PRADO *et al.* (2005) propuseram o desenvolvimento de um modelo experimental para verificar o efeito do *laser* de baixa intensidade na viabilidade do retalho cutâneo randômico (10x4cm) em ratos. Foram utilizados 24 animais, distribuídos em 2 grupos, sendo o grupo 1 (controle) submetido à simulação da radiação *laser* e o grupo 2 (radiação *laser* em 1 ponto a 2,5cm da base do retalho). Foi utilizado *laser* de diodo AsGaAl de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 830nm, área de secção transversal do feixe de  $0,07\text{cm}^2$ , potência de  $30\text{mW}$ , densidade de energia de  $36\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 72 segundos, com início imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. Após 7 dias do ato operatório, foram calculados a área de necrose com o método de gabarito de papel, onde foi obtida uma média significativamente maior no grupo 1 (48,86%) do que no grupo 2 (23,14%). Segundo os autores, o



modelo experimental mostrou-se factível para investigar os efeitos da terapia a *laser* de baixa intensidade em retalho cutâneo randômico em ratos.

ASSIS *et al.* (2006) investigaram diferentes comprimentos de onda e duas potências distintas do *laser* de diodo de alumínio gálio índio fósforo (AlGaInP) de baixa intensidade na viabilidade de retalho cutâneo randômico (10x4cm) em ratos. Foram realizados retalhos cutâneos randômicos em 36 animais, sendo estes distribuídos em 3 grupos com 12 animais cada. O grupo 1 (Controle), o grupo 2 (radiação *laser* de 904nm e potência de 15mW) e o grupo 3 (radiação *laser* de 670nm e potência de 30mW). Todos os animais foram irradiados com densidade de energia de  $16\text{J}/\text{cm}^2$ , com a técnica pontual de contato, em 1 ponto localizado a 2,5cm da base cranial do retalho, imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. No 7º dia pós-operatório, foram calculadas as porcentagens da área de necrose pelo método de gabarito de papel, sendo encontradas diferenças significantes, tanto no grupo 2 (37%) como no grupo 3 (27%) em relação ao controle. Assim, o grupo 3 apresentou melhores resultados quando comparado aos outros grupos, concluindo que a radiação *laser* com comprimento de onda de 670nm e potência de 30mW foi mais eficiente do que com 904nm e potência de 15mW, em retalhos cutâneos randômicos em ratos.

CORAZZA *et al.* (2007) realizaram um estudo com objetivo de comparar os efeitos angiogênicos do *laser* e do *LED* de baixa intensidade

em feridas induzidas em ratos. Foi utilizado o modelo experimental de indução de ferida circular (*punch* com 15mm de diâmetro) no quadríceps de 120 ratos, distribuídos em 5 grupos: grupo controle; grupo *laser* ( $5\text{J}/\text{cm}^2$ , 31 segundos por ponto); grupo *laser* ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ , 126 segundos por ponto); grupo *LED* ( $5\text{J}/\text{cm}^2$ , 17 segundos por ponto) e grupo *LED* ( $20\text{J}/\text{cm}^2$ , 56 segundos por ponto). Foi utilizado o *laser* diodo, com comprimento de onda de 660nm, potência de 40mW e área de secção transversal do feixe de  $0,04\text{cm}^2$ , o *LED* utilizado teve um comprimento de onda de 635nm, potência de 90mW e área de secção transversal do feixe de  $0,085\text{cm}^2$ . A irradiação foi realizada 6 horas após a realização da ferida, em 6 pontos nas margens e 1 ponto no centro da lesão, com a técnica pontual com contato. Foi analisada a angiogênese por meio de histomorfometria (Hematoxilina/eosina) e a contração de feridas nos dias 3, 7, 14 e 21 após a lesão. Nos dias 3, 7 e 14, a proliferação de vasos sanguíneos dos grupos irradiados foi superior em comparação ao do grupo controle, com destaque para o grupo com radiação *LED* a  $5\text{J}/\text{cm}^2$  ( $p < 0,05$ ). No dia 21, os grupos irradiados com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  apresentaram valores estatísticos com maior eficiência na angiogênese quando comparados com o grupo *laser* a  $20\text{J}/\text{cm}^2$ . Tanto o *LED* como o *laser* com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  obtiveram resultados significantes no 21º dia. Segundo os autores, o *laser* e o *LED* vermelho demonstraram resultados expressivos na angiogênese de feridas, e a coerência da fonte de luz não mostrou ser fundamental para os resultados.

BOSSINI *et al.* (2009) investigaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (10x4cm) em

ratos. Foram utilizados 100 animais, distribuídos em 5 grupos contendo 20 animais cada: grupo 1 (controle); grupo 2 (irradiação com densidade de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , 6 segundos por ponto); grupo 3 ( $6\text{J}/\text{cm}^2$ , 12 segundos por ponto); grupo 4 ( $12\text{J}/\text{cm}^2$ , 24 segundos por ponto); grupo 5 ( $24\text{J}/\text{cm}^2$ , 48 segundos por ponto). Foi utilizado o *laser* de AlGaInP de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 670nm, área de secção transversal do feixe de  $0,6\text{cm}^2$ , potência de 30mW, sendo aplicado imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, em 24 pontos sobre e ao redor do retalho cutâneo. No 7º dia pós-operatório foram coletadas amostras, de cada retalho para contagem de vasos sanguíneos e foram avaliadas as porcentagens de necrose pelo método de gabarito de papel. Todos os grupos irradiados mostraram resultados significativos na porcentagem de necrose em relação ao grupo controle, já o grupo 3 ( $6\text{J}/\text{cm}^2$ ) foi significativamente maior quando comparado ao grupo 4 ( $12\text{J}/\text{cm}^2$ ), e o grupo 5 ( $24\text{J}/\text{cm}^2$ ) mostrou aumento significativo na viabilidade do retalho em relação aos demais grupos. Em relação ao número total de vasos sanguíneos, todos os grupos irradiados mostraram aumento significativo de vasos em relação ao grupo controle. Segundo os autores, o *laser* utilizado foi eficaz no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos, em todas as densidades de energias utilizadas, com melhores resultados com densidades de energias mais altas.

CURY *et al.* (2009) investigaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade com dois comprimentos de onda diferentes na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (10x4cm) em ratos. Foram utilizados 70 animais distribuídos em 5 grupos com 12 animais cada, sendo grupo 1

(controle), grupo 2 (*Laser* 660nm, com  $30\text{J}/\text{cm}^2$  e 30 segundos), grupo 3 (*Laser* 780nm, com  $30\text{J}/\text{cm}^2$  e 30 segundos), grupo 4 (*Laser* 660nm, com  $40\text{J}/\text{cm}^2$  e 40 segundos) e grupo 5 (*Laser* 780nm, com  $40\text{J}/\text{cm}^2$  e 40 segundos). A radiação *laser* foi realizada com a técnica pontual com contato, imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, em 24 pontos sobre e ao redor do retalho cutâneo. No 7º dia pós-operatório, foram calculadas as porcentagens da área de necrose com o método de gabarito de papel, e não houve diferença significativa entre o grupo 1 (controle) e os grupos irradiados. Segundo os autores, a radiação *laser* com comprimentos de onda de 660nm e 780nm com densidades de energia de 30 e  $40\text{J}/\text{cm}^2$  não foram eficazes na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos.

PINFILDI *et al.* (2009) avaliaram o efeito do *laser* de baixa intensidade em mastócitos na viabilidade de retalho TRAM (3x5cm) em ratos. Foram utilizados 84 animais distribuídos 7 grupos de 12 animais cada: grupo 1 (controle), grupo 2 (irradiação com  $3\text{J}/\text{cm}^2$  em 1 ponto), o grupo 3 (irradiação com  $3\text{J}/\text{cm}^2$  em 24 pontos), grupo 4 (irradiação com  $72\text{J}/\text{cm}^2$  em 1 ponto), grupo 5 (irradiação com  $6\text{J}/\text{cm}^2$  em 1 ponto), grupo 6 (irradiação com  $6\text{J}/\text{cm}^2$  em 24 pontos), e grupo 7 (irradiação com  $144\text{J}/\text{cm}^2$  em 1 ponto). O grupos 2, 4, 5 e 7 foram irradiados em 1 ponto no pedículo do TRAM e os grupos 3 e 6 foram irradiados em 24 pontos sobre e ao redor do retalho. Todos os grupos experimentais foram submetidos à radiação *laser* de diodo AlGaInP de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 670nm, com área de secção transversal do feixe de  $0,06\text{cm}^2$ , potência de 30mW, imediatamente após o

ato operatório e nos 2 dias subsequentes. A porcentagem da área de necrose do retalho foi calculada no 4º dia pós-operatório com o método de gabarito de papel e duas amostras de pele foram coletadas de cada animal com um *punch* de 1cm<sup>2</sup> para realizar a avaliação dos mastócitos. Aumento significativo na porcentagem da área de necrose do grupo 1 (controle) foi encontrado em relação aos grupos irradiados. Na avaliação de mastócitos, o grupo 1 (controle) obteve menor número de mastócitos quando comparado com os grupos 5 (6J/cm<sup>2</sup> em 1 ponto) e 7 (144J/cm<sup>2</sup> em 1 ponto). Assim, o *laser* de baixa intensidade com comprimento de onda de 670nm foi eficaz na viabilidade do TRAM. Segundo os autores o *laser* pode estimular o aumento do número de mastócitos, aumentando a perfusão vascular.

PRADO *et al.* (2009) tiveram como objetivo determinar o local mais eficaz para a radiação *laser* de baixa intensidade, na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (10x4cm) em ratos. Foram utilizados 70 animais, distribuídos em 7 grupos, com 10 animais cada: Grupo 1 (controle); grupo 2 (irradiação em 1 ponto a 5cm da base cranial do retalho); grupo 3 (irradiação em 2 pontos a 5 e 7,5cm da base cranial); grupo 4 (irradiação em 3 pontos a 2,5, 5 e 7,5cm da base cranial); grupo 5 (irradiação em 1 ponto a 2,5cm da base cranial); grupo 6 (irradiação em 2 pontos a 2,5 e 5cm da base cranial); grupo 7 (irradiação em 1 ponto a 7,5 cm da base cranial). Foi utilizado o *laser* diodo de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 830nm, área de secção transversal do feixe de 0,6cm<sup>2</sup>, potência de 30mW, densidade de energia de 36J/cm<sup>2</sup> por ponto, durante 72 segundos, sendo aplicado imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. No 7º dia após o ato

operatório foi avaliada a porcentagem de área de necrose pelo método de gabarito de papel. Os resultados mostraram aumento significativo na porcentagem de necrose do grupo 1 (controle) em relação aos grupos 3, 4, 5 e 6. Além disso, o grupo 5 mostrou aumento significativo na viabilidade do retalho cutâneo em relação aos demais grupos. Em conclusão, o *laser* foi eficaz na viabilidade do retalho cutâneo em ratos, e o local mais eficaz da radiação *laser* foi em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho.

COSTA *et al.* (2010) investigaram o efeito de diferentes potências do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (10x4cm) em ratos. Foram utilizados 36 animais distribuídos em 3 grupos sendo: Grupo 1 (Controle); Grupo 2 (radiação *laser* com potência de 30mW) e Grupo 3 (radiação *laser* com potência de 60mW). Foi utilizado o *laser* de AlGaInP de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimento de onda de 660nm, área de secção transversal do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 3J/cm<sup>2</sup> e o *laser* foi aplicado imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, em 24 pontos sobre e ao redor do retalho. No 7º dia após o ato operatório foi avaliada a porcentagem da área de necrose pelo método de gabarito de papel escaneado eletronicamente e calculado em pixels, e foram retirados 4 fragmentos de pele de cada animal para análise de densidade vascular por coloração de hematoxilina/eosina. Em relação a porcentagem da área de necrose foi observada diferença significativa do grupo controle (53%) em relação ao grupo 2 (24%) e grupo 3 (25%), porém, não houve diferença significativa entre os mesmos. Na densidade vascular foi obtida diferença significativa do grupo controle (37%) quando comparado ao grupo 2 (57%)

e grupo 3 (59%). Assim, o *laser* de baixa intensidade aumentou a viabilidade de retalho cutâneo randômico, tanto com a potência de 30mW como com 60mW, com melhor resultado de densidade vascular com 60mW.

PRADO *et al.* (2010) tiveram como objetivo avaliar os efeitos do *laser* de baixa intensidade na concentração de malondialdeído (MDA), na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (10x4cm) em ratos. Foram utilizados 30 animais distribuídos em 3 grupos com 10 cada, sendo grupo 1 (controle), grupo 2 (radiação *laser* 830nm) e grupo 3 (radiação *laser* 670nm). Foi utilizado o *laser* de diodo de baixa intensidade com a técnica pontual com contato, com comprimentos de onda de 670nm e 830nm, área de secção do feixe de  $0,06\text{cm}^2$ , com potência de 30mW, densidade de energia de  $36\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 72 segundos, foi aplicado imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho. No 7º dia pós-operatório foi calculada a porcentagem da área de necrose com o método de gabarito de papel e foram coletadas amostras de pele para determinar a concentração de MDA. Diferenças significantes foram encontradas na porcentagem da área de necrose do grupo controle (48,04%) em relação ao grupo 2 (33,6%) e grupo 3 (30,22%), sendo que estes não mostraram diferenças significantes entre eles. Em relação a concentração de MDA houve diferença significante do grupo controle (7,38) quando comparado com o grupo 3 (4,96), porém, não houve diferença significante em relação ao grupo 2. Neste estudo concluiu-se que o *laser* de baixa intensidade foi eficiente no aumento da viabilidade do retalho cutâneo em ratos, sem diferença significante entre os

comprimentos de onda, porém, o *laser* de 670nm foi eficaz na redução da concentração de MDA tecidual.



## **MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Desenho de pesquisa

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, aleatorizado, unicego e controlado. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, sob o protocolo n° 1104/08. (Apêndice 1)

### 4.2 Amostra

Para realização do estudo, foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus: albinus, Rodentia, Mammalia*), machos, adultos, com 8 semanas de idade e massa corpórea 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 própria comum e água *ad libitum* durante todo o período do trabalho, permanecendo sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura

constante de 22°C, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2007).

### 4.3 Delineamento Experimental

Os animais foram pesados e distribuídos em 4 grupos, com aleatorização pelo programa Bioestat 3.0, contendo 12 animais cada. Todos os animais foram submetidos à realização do retalho cutâneo randômico, 1 min após o término da sutura foram realizadas as radiações correspondentes a cada grupo experimental, como segue (Figura 1).

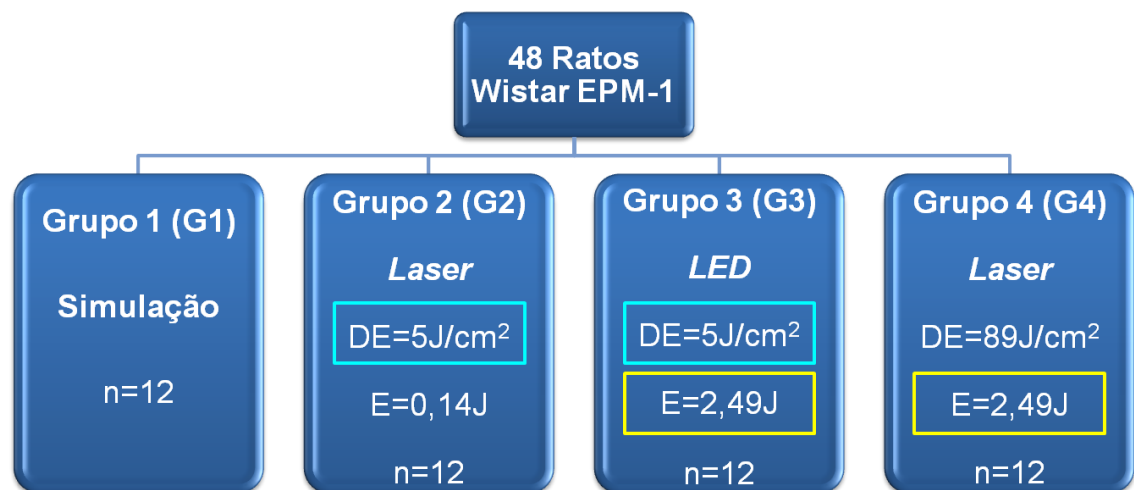


Figura 1- Organograma ilustrando a distribuição dos grupos.

**Grupo 1 (Simulação):** simulação da radiação *laser* de baixa intensidade com o equipamento desligado, durante 5 dias consecutivos;

**Grupo 2 (*Laser 0,14J*) :** radiação *laser* de baixa intensidade, com densidade de energia (DE) de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , energia total (E) de 0,14J, durante 5 dias consecutivos;

**Grupo 3 (*LED 2,49J*):** radiação *LED* de baixa intensidade, com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , energia total de 2,49J, durante 5 dias consecutivos;

**Grupo 4 (*Laser 2,49J*):** radiação *laser* de baixa intensidade, com densidade de energia  $89\text{J}/\text{cm}^2$ , energia total de 2,49J, correspondendo a mesma energia total do G3, durante 5 dias consecutivos.

#### 4.4 Técnica operatória

Para a realização do retalho cutâneo randômico, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio direito, com cloridrato de ketamina (100mg/kg) associado à cloridrato de xilazina (50mg/kg). Para aplicação dos mesmos, foi utilizada seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 4,5x13mm.

No plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha cirúrgica para realização da epilação digital da região dorsal, em uma área de 12cm de comprimento, 6cm de largura craniocaudal, adotando como limite cranial a margem superior das escápulas e como limite caudal 1cm abaixo das cristas ilíacas.

Após a epilação digital, o retalho cutâneo randômico dorsal, de base cranial, foi demarcado com as medidas padrão de 10cm de comprimento no sentido craniocaudal e 4cm de largura no sentido laterolateral. O retalho teve como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica (McFARLANE, DEYOUNG, HENRY, 1965) (Figura 2). A pele foi incisada em todo o perímetro do retalho com auxílio de lâmina de bisturí número 11. Todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador, que não teve conhecimento dos grupos aos quais os animais pertenciam.

Os retalhos foram elevados a partir da fáscia profunda dos músculos, englobando fáscia superficial, panículo carnoso e pele (Figura 3).

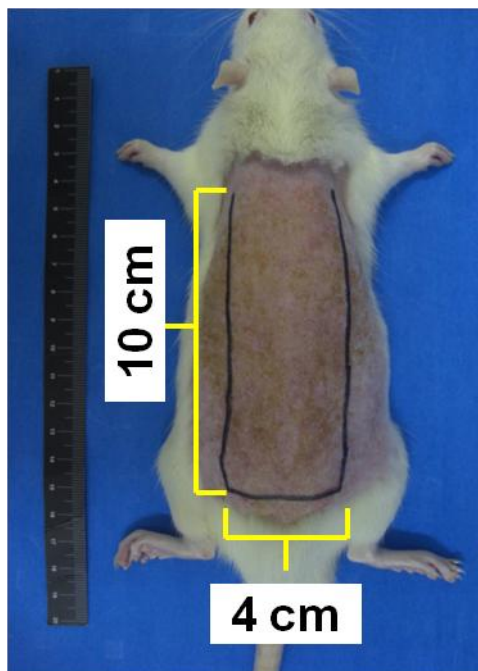


Figura 2 – Animal demarcado com as medidas padrão do retalho cutâneo randômico 10x4cm.



Figura 3 – Retalho elevado contendo pele e panículo carnoso.

Em seguida, foi interposta barreira plástica impermeável (filme F1-poliéster e polietileno), recortada nas medidas padrão (10cm x 4cm) entre o retalho e seu leito (KORLOF & UGLAND, 1966) (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 da barreira plástica de filme impermeável sobre o leito do retalho.



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

Após o término do ato operatório e, diariamente, até o dia da eutanásia, foi realizada analgesia, com 5mg/kg de Cloridrato de Tramadol, por gavagem.

## 4.5 Equipamentos

Foi utilizado aparelho emissor de radiação *laser* de baixa intensidade, *Thera Lase*® da DMC Equipamentos Ltda., emitindo comprimento de onda de ( $\lambda$ ) 660nm, Alumínio Gálio Índio Fósforo (AlGaInP), com potência de 60mW, com densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup> e 89J/cm<sup>2</sup>, com área de secção transversal do feixe de 0,028cm<sup>2</sup> e com fibra óptica (Figura 6).

Também foi utilizado aparelho de luz *LED* de baixa intensidade, *FisioLED*® da MMOptics Ltda., emitindo comprimento de onda de ( $\lambda$ ) 630nm +/- 10nm, AlGaInP, potência de 150mW, densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup> e área de secção transversal do feixe de 0,5cm<sup>2</sup>. Foi utilizada ponteira de acrílico na extremidade da caneta para direcionar o feixe luminoso (Figura 7).

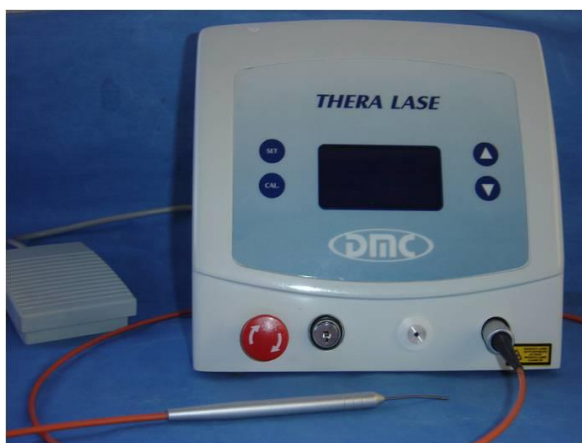


Figura 6 - Equipamento *laser* de baixa intensidade 660nm (AlGaInP).



Figura 7 - Equipamento de *LED* 630nm (AlGaInP).

Os equipamentos de *laser* e *LED* foram aferidos antes e após o experimento.

#### 4.6 Procedimento de radiação

De acordo com o delineamento experimental, as aplicações da luz *laser* ou *LED* foram iniciadas de modo consecutivo e ininterrupto, durante 5 dias, começando no mesmo dia, 1 minuto após o término da realização do retalho cutâneo randômico em todos os animais. Nos demais dias, o procedimento foi repetido, sempre no mesmo período.

Os animais do G1(Simulação) foram submetidos à simulação da irradiação, com o aparelho *laser* desligado, durante 83 segundos.

Os animais do G2 (*Laser* 0,14J) foram submetidos à radiação *laser*, com comprimento de onda de 660nm (AlGaInP), com área de secção transversal do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, com potência de 60mW, densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup>, durante 2,3s, com energia total de 0,14J.

Os animais do grupo 3 (*LED* 2,49J) foram submetidos à radiação *LED*, com área de secção transversal do feixe de 0,5cm<sup>2</sup>, com comprimento de onda de 630nm, potência de 150mW, densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup>, durante 16,6s, com energia total de 2,49J.

Os animais do grupo 4 (*Laser* 2,49J) foram submetidos à radiação *laser*, com área de secção transversal do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, com comprimento de onda de 660nm, potência de 60mW, densidade de energia de 89J/cm<sup>2</sup>, durante 41,5s, tendo a mesma energia total do G3 de 2,49J.



Em todos os grupos, a aplicação do *laser* e do *LED* foram realizadas com a técnica pontual com contato, em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho e a 2,0cm equidistantes das margens laterais do retalho. Foi utilizado gabarito plástico sobre o retalho em todos os grupos, com a demarcação do ponto onde foi realizada a irradiação, mantendo angulação de 90°, perpendicular ao tecido (Figuras 8 e 9).

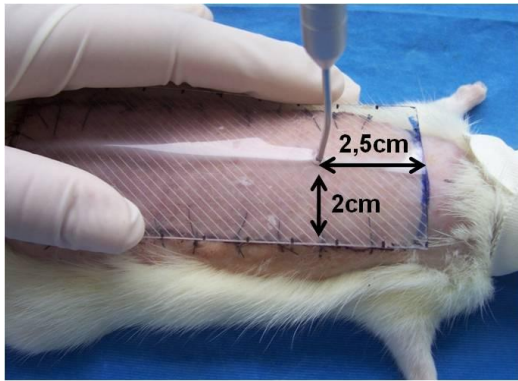


Figura 8 - Gabarito plástico para aplicação do *laser* a 2,5cm da base cranial e a 2,0cm equidistantes das margens laterais do retalho.

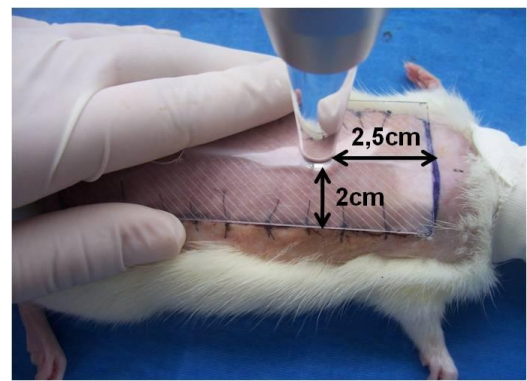


Figura 9 - Gabarito plástico para aplicação do *LED* a 2,5cm da base cranial e a 2,0cm equidistantes das margens laterais do retalho.

Ao final do 7º dia, foi realizada a eutanásia dos animais por *overdose* de anestésico (250mg/kg de cloridrato de xilazina e 500mg/Kg de cloridrato de ketamina), procedimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP. Logo após foram submetidos à avaliação da porcentagem da área de necrose por meio do método gabarito de papel.

Em seguida, foram retiradas duas amostras de pele para realização da avaliação de densidade vascular com coloração de Hematoxilina e Eosina e avaliação da exocitose de mastócitos com coloração de Azul de Toluidina.

Em todos os animais, com auxílio de caneta dermatográfica foi demarcado um quadrado com área de  $1\text{cm}^2$ , sobre o ponto de irradiação, a 2,5cm da base cranial do retalho cutâneo randômico e a 1,5cm equidistantes das margens laterais do retalho, referente à amostra A, e a amostra B com as mesmas dimensões foi obtida sobre a linha de transição do retalho e a 1,5cm equidistante das margens laterais do retalho (Figura 10).

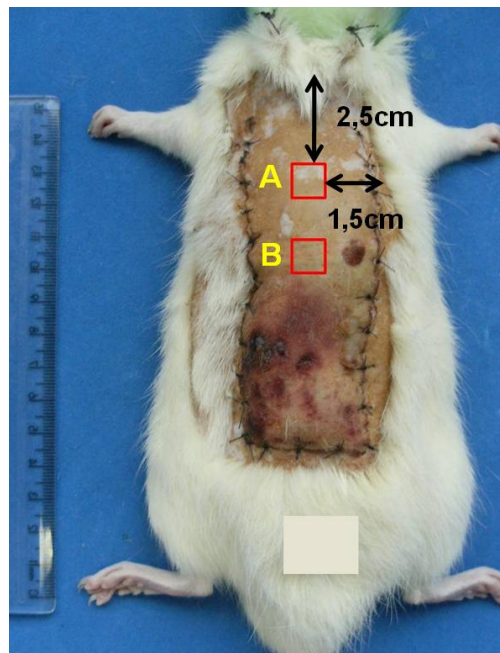


Figura 10 - Amostras de pele (A e B) retiradas para avaliações de densidade vascular e exocitose de mastócitos

#### 4.7 Análises macroscópicas da área de necrose

No 7º dia após o ato operatório, os animais foram anestesiados, com a associação de de cloridrato de ketamina (100mg/kg) e cloridrato de

xilazina (50mg/kg) para realização da análise macroscópica pelo método de gabarito de papel (SANO *et al.*, 2001), para quantificar a porcentagem de necrose no retalho cutâneo randômico. Para esta avaliação foi utilizado papel vegetal, grafite 2B e *Software* Adobe Photoshop CS/2®.

Ao atingirem o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para sobrepor um corte de papel vegetal, medindo 8,0cm de largura e 14,0cm de comprimento. Com grafite 2B, toda a área do retalho e o limite entre o tecido viável (pele macia, rósea, quente e com pelos) e o necrosado (pele rígida, escurecida, fria e sem pelos) foram demarcados no papel vegetal (figura 11). Esta avaliação foi realizada por dois pesquisadores que não tinham conhecimento a qual grupo os animais pertenciam.



Figura 11 – Gabarito de papel, com as demarcações da área total do retalho e do limite entre tecido viável e tecido necrosado.

Os moldes desenhados em papel vegetal foram digitalizados em escâner, na resolução de 300dpi. 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 12).

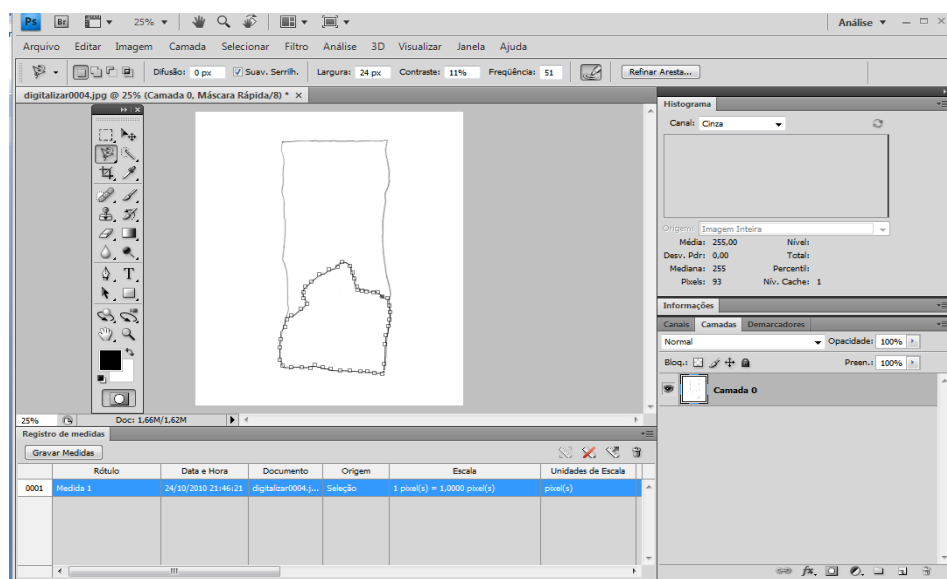


Figura 12 - Molde digitalizado para mensuração da área total e da área de necrose do retalho em pixels pelo Adobe Photoshop.

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

$$\text{Porcentagem da área de necrose do retalho} = \frac{\text{Número de pixels da área de necrose do retalho}}{\text{Número de pixels da área total do retalho}} \times 100$$

Os valores de área de necrose e da área total do retalho foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> para organização dos dados, formatação das tabelas, e para análise estatística.

#### **4.8 Análises microscópicas de densidade vascular e mastócitos**

As amostras de pele retiradas foram fixadas em solução de Formalina tamponada a 10%, por 24 horas. Em seguida, cada amostra foi processada em banhos crescentes de álcool, seguidos pela clarificação em banhos de xilol, infiltrados em parafina a 60°C, e posteriormente, emblocados em parafina.

As amostras de pele inclusas nos blocos de parafina foram cortadas longitudinalmente em cortes semisseriados com 3µm por meio de micrótomo rotativo. Os cortes foram montados em laminas histológicas com lamínulas sobre o tecido, sendo duas lâminas para cada amostra de pele. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água deionizada.

Uma lâmina de cada amostra foi confeccionada para coloração, de rotina, por Hematoxilina e Eosina para avaliação de densidade vascular, e outra lâmina para coloração, de rotina, com Azul de Toluidina para avaliação da exocitose dos mastócitos. Após serem coradas, as lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula para a realização da morfometria.

Para morfometria de densidade vascular e exocitose dos mastócitos foi utilizado o método de contagem morfométrica, expresso em porcentagem estereológica, seguindo o princípio de Delesse, sugerido por

ARIAS & SOARES (2000). Para esta mensuração, foram realizadas 4 fotomicrografias de cada lâmina, com câmera digital Sony® acoplada ao microscópio óptico Zeiss®, com aumento de 400x (objetiva de 40x e ocular de 10x - área de 0,622 mm<sup>2</sup>/campo).

A primeira fotomicrografia foi tirada após a identificação da área com maior número de vasos e mastócitos da lâmina, seguindo de mais três fotomicrografias tiradas em campos sequenciais a partir da primeira área escolhida, foi realizada a contagem de vasos e mastócitos individualizados em campos de 400x.

Os vasos foram definidos como agrupamentos de células endoteliais que determinam espaços luminais, independente da presença de hemácias. Células endoteliais isoladas não foram contadas. Tomou-se o cuidado de considerar vasos claramente definidos. Células estromais, macrófagos e outros elementos inflamatórios eventualmente corados de maneira inespecífica não foram contados. Os resultados foram expressos, como a média do número de vasos em campos de maior densidade vascular por campo de 400x.

As fotomicrografias foram utilizadas para a morfometria de densidade vascular e exocitose de mastócitos, que foi realizada por dois pesquisadores, que não tinham conhecimento a qual grupo as lâminas pertenciam.

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

#### 4.9 Análise estatística

Os métodos estatísticos adotados foram os mesmos para as variáveis de área de necrose, densidade vascular e exocitose de mastócitos.

O Teste de Kolmogorov Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade das variáveis. Para a comparação entre os dois avaliadores foi aplicado o Teste T Pareado.

O Teste de Análise de Variância (ANOVA) foi aplicado para identificar diferenças entre os quatro grupos, para cada variável.

Para identificar quais grupos obtiveram diferença foi aplicado o Teste de Tukey. O Teste T pareado foi aplicado para comparação entre as amostras A e B de cada grupo.

Para avaliar se houve correlação entre as porcentagens de necrose e os valores obtidos com densidade vascular e exocitose de mastócitos, foi aplicado o Coeficiente de Correlação Pearson.

O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05 ou 5%.

## **RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

O Teste de Kolmogorov Smirnov foi aplicado em todas as variáveis e foram obtidas distribuição normal dos dados nas avaliações da área de necrose (Apêndice 2), densidade vascular (Apêndice 3) e exocitose de mastócitos (Apêndice 4), nas amostras A e B.

Em relação a porcentagem da área de necrose, foram comparados os dados entre os avaliadores pelo o Teste T pareado, que não demonstrou diferença significativa (Apêndice 5) entre eles, sendo assim, foram utilizados os dados do avaliador 1. Para verificar as diferenças significantes na porcentagem de área de necrose entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 (Tabela 1).

Tabela 1- Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação aos grupos

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	36.96	2.40	5.37	7.91
R2	36.96	29.17	17.36	10.74
R3	26.70	24.92	17.65	16.22
R4	22.67	5.46	20.69	27.46
R5	23.77	14.59	1.06	13.54
R6	23.03	28.43	17.00	14.77
R7	24.81	24.76	10.47	4.67
R8	32.65	27.01	8.05	24.43
R9	19.95	23.99	13.08	14.56
R10	41.46	27.25	25.19	12.53
R11	19.42	21.54	19.75	8.93
R12	36.06	35.33	13.35	12.68
Média	28.70	22.07	14.08	14.03
Mediana	23.92	26.59	13.73	9.72

De acordo com os resultados demonstrados nos dados da Tabela 1, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Essa diferença foi evidenciada com o Teste de Tukey, que mostrou que as diferenças significantes foram do grupo 1 (Simulação) com o grupo 3 (*LED* 2,49J) e grupo 4 (*Laser* 2,49J) ( $p=0,000$ ), e a porcentagem da área de necrose mais elevada foi obtida no grupo 1 (28,70%).

Quando foi comparado o grupo 2 (*Laser* 0,14J) com o grupo 3 ( $p=0,02$ ) e grupo 4 ( $p=0,0034$ ) obteve-se diferença significativa, tendo o grupo 2 (22,07%) os valores mais elevados de área de necrose. Na comparação entre o grupo 1 (Simulação) e o 2 (*Laser* 0,14J), não houve diferença significativa ( $p=0,073$ ) (Figura 13).

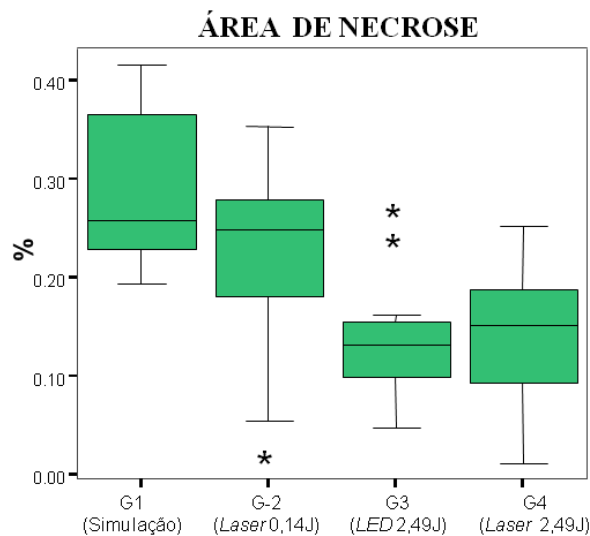


Figura 13 - Distribuição dos valores da porcentagem da área de necrose dos grupos.

Em relação a análise microscópica de densidade vascular da amostra A, foram comparados os dados entre os avaliadores pelo o Teste T pareado, que não demonstrou diferença significativa (Apêndice 6) entre eles, sendo assim, foram utilizados os dados do avaliador 1. Para verificar as diferenças significantes na densidade vascular da amostra A entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 (Tabela 2).

Tabela 2- Comparação entre grupos em relação à densidade vascular da amostra A.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	31	36	38	24
R2	22	38	39	22
R3	24	16	25	12
R4	24	20	40	30
R5	25	34	25	28
R6	12	37	26	27
R7	24	26	36	32
R8	20	21	22	36
R9	25	25	24	46
R10	26	24	21	36
R11	20	15	19	37
R12	11	17	32	13
Média	22	25,75	28,91	28,58
Mediana	18	31,5	31	29,5

De acordo com os resultados demonstrados nos dados da Tabela 2, não foram encontradas diferenças significantes na comparação entre os grupos. O grupo 1 (22) obteve menores valores em relação aos grupos irradiados, sendo os grupos 2 (25,75), grupo 3 (28,91) e grupo 4 (28,58) (Figura 14).

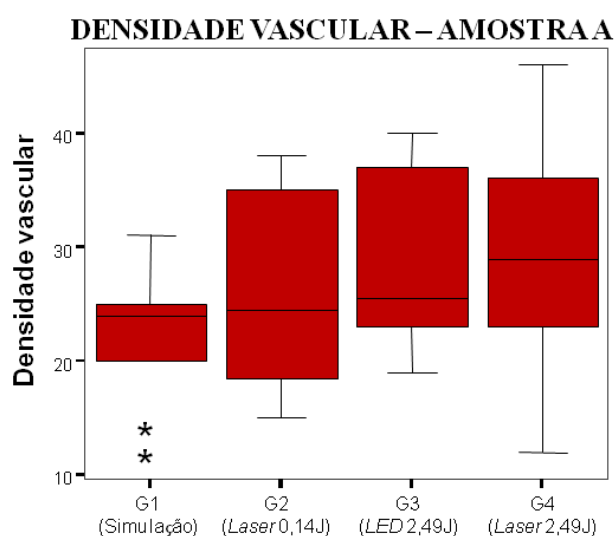


Figura 14 - Distribuição dos valores de densidade vascular da amostra A.

Em relação a análise microscópica de densidade vascular da amostra B, foram comparados os dados entre os avaliadores pelo o Teste T pareado, que não demonstrou diferença significativa (Apêndice 7) entre eles, sendo assim, foram utilizados os dados do avaliador 1. Para verificar as diferenças significantes na densidade vascular da amostra B entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 (Tabela 3).

Tabela 3- Comparação entre grupos em relação à densidade vascular da amostra B.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	6	10	25	59
R2	2	5	14	12
R3	17	19	19	1
R4	10	56	46	15
R5	34	27	28	38
R6	17	14	41	34
R7	26	11	34	16
R8	8	41	45	14
R9	10	29	22	33
R10	23	22	25	11
R11	2	21	45	40
R12	6	28	12	55
Média	13,41	23,58	29,66	27,33
Mediana	21,5	12,5	37,5	25

De acordo com os resultados demonstrados nos dados da Tabela 3, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Essa diferença foi evidenciada com o Teste de Tukey, que mostrou que as diferenças significantes foram do grupo 1 (simulação) com o grupo 3 (*LED 2,49J*) ( $p=0,04$ ), tendo o grupo 1 (13,41) os menores valores em relação ao grupo 3 (29,66). Não houve diferença significativa na comparação entre os outros grupos (Figura 15).

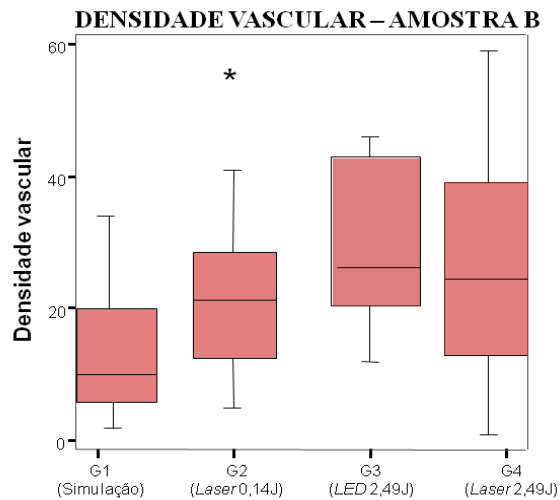


Figura 15 - Distribuição dos valores das médias de densidade vascular da amostra

Para evidenciar se houve diferença significativa de densidade vascular de cada grupo entre as amostras A e B, foi utilizado o Teste T pareado, com nível de significância estabelecido em  $p \leq 0,05$  (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre Amostras A e B em relação à densidade vascular

Variáveis Analisadas	Valor p
G1 (amostra A) X G1 (Amostra B)	0,017 *
G2 (amostra A) X G2 (Amostra B)	0,714
G3 (amostra A) X G3 (Amostra B)	0,872
G4 (amostra A) X G4 (Amostra B)	0,844

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 4, foi encontrada diferença significativa na comparação das amostra A com a B somente no grupo 1 (simulação) ( $p=0,017$ ). Não houve diferenças significantes na comparação entre as amostras dos outros grupos.

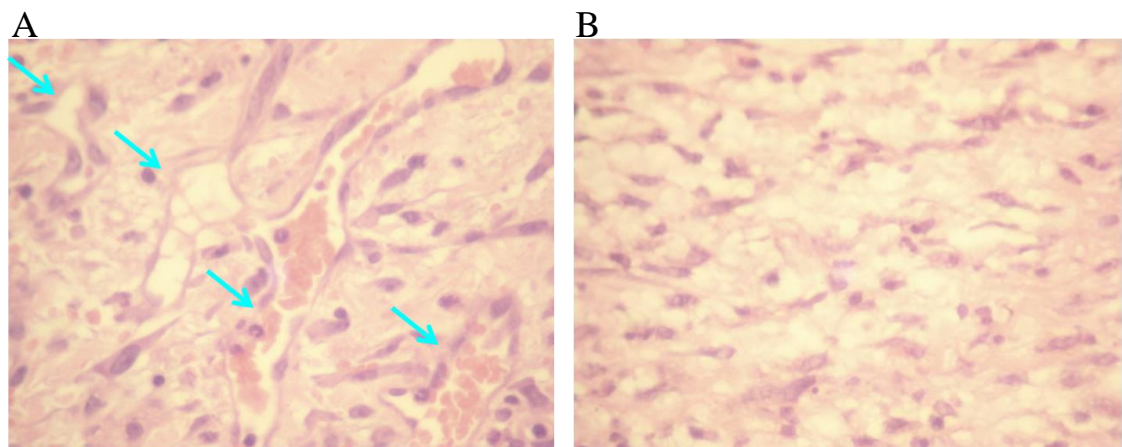


Figura 16 – A: Lâmina de Hematoxilina/Eosina da amostra A, com aumento de 400x com as setas indicando os vasos sanguíneos. B: Lâmina de Hematoxilina/Eosina da amostra B, com aumento de 400x.

Em relação a análise microscópica da exocitose de mastócitos da amostra A, foram comparados os dados entre os avaliadores pelo o Teste T pareado, que não demonstrou diferença significativa (Apêndice 8) entre eles, sendo assim, foram utilizados os dados do avaliador 1. Para verificar diferenças significantes entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 (Tabela 5).

Tabela 5- Comparação entre grupos em relação à mastócitos da amostra A.

Animal	Grupo 1 (Simulação)	Grupo 2 (Laser 0,14J)	Grupo 3 (LED 2,49J)	Grupo 4 (Laser 2,49J)
R1	14	9	20	16
R2	10	16	6	13
R3	14	0	18	6
R4	9	10	15	17
R5	27	15	18	9
R6	11	14	20	4
R7	13	16	6	13
R8	11	1	13	11
R9	10	6	17	7
R10	19	2	12	13
R11	9	5	11	17
R12	0	11	12	16
Média	12.5	8.75	14	11.83
Mediana	12	15	13	8.5

De acordo com os resultados demonstrados nos dados da Tabela 5, não foram encontradas diferenças significantes na comparação entre os grupos. Tendo o grupo 3 (14) valores maiores em relação ao grupo 2 (8,75), grupo 4 (11,83) e grupo 1 (12,5) (Figura 17).

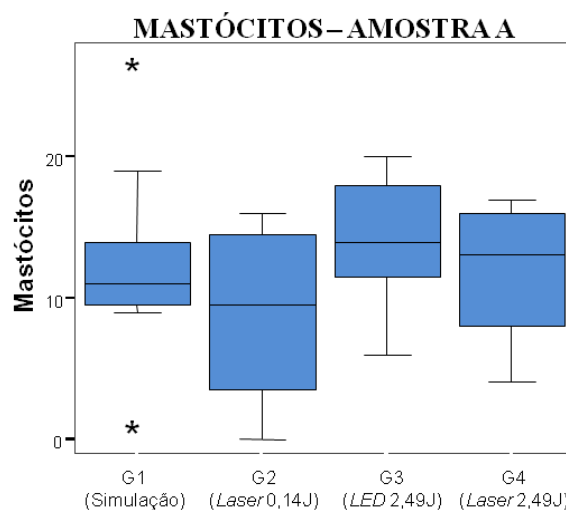


Figura 17 - Distribuição dos valores da exocitose de mastócitos da amostra A.



Em relação a análise microscópica da exocitose de mastócitos da amostra B, foram comparados os dados entre os avaliadores pelo o Teste T pareado, que não demonstrou diferença significativa (Apêndice 9) entre eles, sendo assim, foram utilizados os dados do avaliador 1. Para verificar as diferenças significantes entre os quatro grupos do estudo foi utilizado o Teste ANOVA. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 (Tabela 6).

Tabela 6- Comparação entre grupos em relação à mastócitos da amostra B.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Controle)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	7	8	12	5
R2	2	9	3	7
R3	3	1	5	3
R4	2	2	7	4
R5	3	3	6	3
R6	9	3	2	4
R7	2	1	5	11
R8	1	1	5	7
R9	4	4	4	5
R10	2	5	6	4
R11	1	2	10	5
R12	3	5	11	2
Média	3,25	3,66	6,33	5
Mediana	5,5	2	3,5	7,5

De acordo com os resultados demonstrados nos dados da Tabela 6, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos. Essa diferença foi evidenciada com o Teste de Tukey, que mostrou que as diferenças significantes foram do grupo 1 (simulação) e 3 (*LED 2,49J*) ( $p=0,03$ ), e o

grupo 1 (3,25) obteve valores menores em relação ao grupo 3 (6,33). Na comparação entre os outros grupos, não houve diferenças significantes (Figura 18).

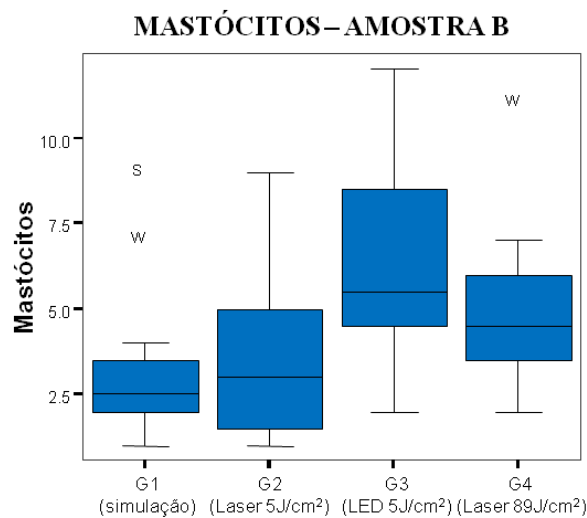


Figura 18– Distribuição dos valores das médias de mastócitos da amostra B.

Para evidenciar se houve diferenças significantes da exocitose de mastócitos de cada grupo entre as amostras A e B, foi utilizado o Teste T pareado, com nível de significância estabelecido em  $p \leq 0,05$  (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre Amostras A e B em relação à mastócitos

Variáveis Analisadas	Valor p
G1 (amostra A) X G1 (Amostra B)	0,001 *
G2 (amostra A) X G2 (Amostra B)	0,010 *
G3 (amostra A) X G3 (Amostra B)	0,001 *
G4 (amostra A) X G4 (Amostra B)	0,000 *

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 7, foram encontradas diferenças significantes no número de mastócitos entre as amostras A e B, em todos os grupos do estudo.

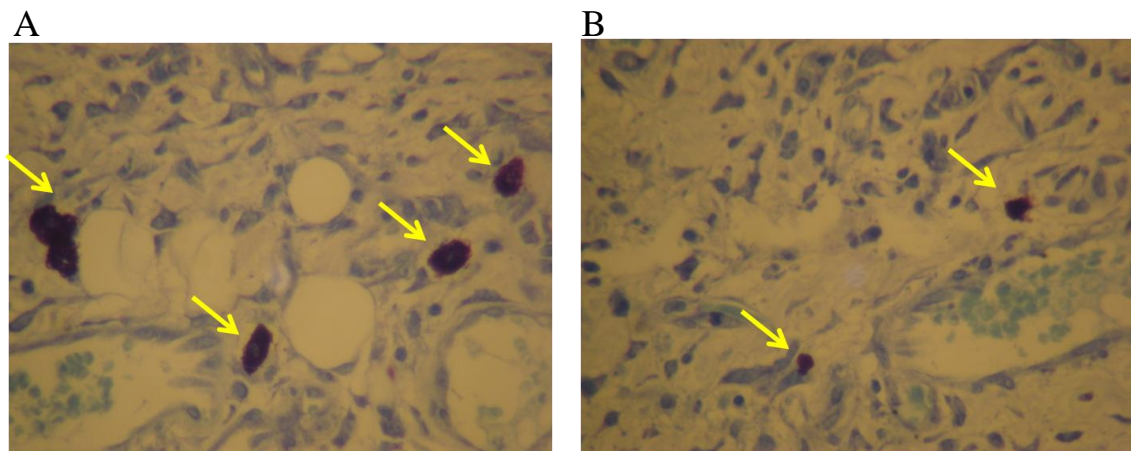


Figura 19 – A: Lâmina de Azul de Toluidina da amostra A, com aumento de 400x com as setas indicando mastócitos. B: Lâmina de Azul de Toluidina da amostra B, com aumento de 400x com as setas indicando mastócitos.

No Teste de Correlação de Pearson não houve correlação entre as variáveis de porcentagem de necrose e os valores obtidos com densidade vascular e exocitose de mastócitos, tanto no amostra A como na amostra B (Apêndice 10) .

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

O retalho cutâneo representa um procedimento comum e de grande valia dentro da cirurgia plástica. O procedimento cirúrgico é utilizado à séculos e, durante este tempo, tem sido desenvolvidas diversas técnicas para proporcionar maior segurança na realização de retalhos cutâneos (HARASHIMA, SAWADA, WATANABE, 1977; KERRIGAN, 1983; FERREIRA *et al.*, 1986; FERREIRA, ANDREWS, FILHO, 1987). No entanto, há fatores de risco, como isquemia e necrose que podem prejudicar sua evolução, justificando a necessidade de investigar medidas para reduzir esses riscos, aumentando a viabilidade do retalho (BARTHE, SUAREZ, ORTEGA, 1991; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; HARDER *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005).

Assim, foram desenvolvidos modelos experimentais de retalhos para investigar a fisiopatologia da viabilidade do tecido e da perfusão vascular do retalho (MCFARLANE, DEYOUNG, HENRY, 1965; DUNN, HUFF, MANCOLL, 1993; ELY & FERREIRA, 2003). No presente estudo, foi adotado como modelo experimental o retalho cutâneo randômico dorsal, de base cranial, com dimensões de 10cm de comprimento e 4cm de largura, proposto por MCFARLANE, DE YOUNG, HENRY (1965). A curva de aprendizado do pesquisador foi de extrema importância para realização do retalho cutâneo, uma vez que um dos fatores de risco extrínsecos é a técnica operatória, o que poderia causar um viés nos métodos do estudo.

O retalho cutâneo randômico é o mais frequentemente utilizado nos estudos sobre retalhos. No entanto, este modelo utiliza um retalho aleatório,

o que resulta em variações na vasculatura da pele, circulação sanguínea e necrose instáveis (YANG & MORRIS, 1999). Contudo, para se obter condições homogêneas de isquemia e necrose, foi interposta uma barreira plástica entre o retalho e seu leito, a fim de impedir a revascularização através dos vasos do mesmo, conforme descrito por KORLOF & UGLAND (1966) e utilizado em outros estudos (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; LIEBANO, FERREIRA, SABINO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010).

No presente estudo, este modelo experimental foi realizado em ratos, pela facilidade de busca por resultados em níveis celulares, isso auxilia no esclarecimento de mecanismos que levam ao aumento da perfusão vascular, para posteriormente ser aplicado em seres humanos. Além disso, a maioria dos estudos utilizou esse animal, o que possibilita comparações dos resultados obtidos, facilitando o desenvolvimento da investigação (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA & OHSHIRO, 1996; KUBOTA, 2002; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2010).

Modalidades de tratamento que aumentem o influxo arterial para o retalho ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos podem trazer benefícios, aumentando a viabilidade do retalho cutâneo, isso tornou possível a avaliação dos efeitos de diversos agentes químicos e físicos na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos (KORLOF & UGLAND, 1966; KERRIGAN, 1983; KJARTANSSON *et al.*, 1988; ASAI, FUKUTA, TORII, 1997; GHERARDINI *et al.*, 1999; SCHANAIDER *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 1999; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; LIEBANO,

FERREIRA, SABINO, 2002; FREIRE *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005; TYNER *et al.*, 2006).

Estudos experimentais utilizando agentes físicos, como a terapia *laser* de baixa intensidade em retalhos cutâneos, demonstraram a capacidade de promover angiogênese e aumento do fluxo sanguíneo que mostraram resultados significativos em relação à diminuição da área de necrose dos mesmos (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; ASSIS *et al.*, 2006; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2010).

Mesmo com resultados positivos em relação à viabilidade do retalho, há diversos parâmetros da radiação *laser* que podem interferir na atividade celular e, por consequência, nos resultados (LUNDEBERG & MALM, 1991; SCHINDL *et al.*, 1998, SCHINDL *et al.*, 1999; PELOW, CHUNG, BAXTER, 2010). Atualmente, há disponibilidade comercial de outras fontes de luz, como o diodo emissor de luz (*LED*). No entanto, a escassez de literatura sobre o *LED* é responsável pela consulta da literatura proveniente de estudos, utilizando o *laser* de baixa intensidade (LOWE *et al.*, 1998).

Em relação às diferenças entre as fontes de luz, os efeitos estimulantes do *laser* de baixa intensidade sobre objetos biológicos foram explicados pela coerência do feixe de luz emitido, ou seja, os picos e depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo e na mesma direção. Além disso, o *laser* possui propriedades, como a monocromaticidade, indicando que a radiação é constituída de fótons com o mesmo comprimento de onda. A colimação consiste no alto grau de paralelismo do feixe de luz do *laser*, de tal forma que a luz mantém um

pequeno tamanho de saída do feixe por uma longa distância (MESTER, MESTER, MESTER, 1985; BOULTON & MARSHALL, 1986; LOWE *et al.*, 1998; REDDY, 2003). Por outro lado, o *LED* emite feixes de luz sem coerência e sem colimação (ABRAMOVITS, ARRAZOLA, GUPTA, 2005; BAROLET, 2008; KOMINE *et al.*, 2010).

As propriedades das fontes de luz *laser* e *LED* ainda geram controvérsias na literatura, HODE (2005), por meio de uma revisão bibliográfica, afirmou que as respostas biológicas dependem da coerência da luz, justificando uma maior eficiência em relação à luz não coerente. No entanto, as conclusões de alguns estudos demonstraram que a coerência do feixe de luz não é responsável pelos efeitos do *laser*, pois, pelas propriedades de espalhamento dos tecidos, a coerência é perdida (KANA *et al.*, 1981; BAXTER, 1991; PONTINEN, AALTOKALLIO, KOLARI 1996; WHELAN *et al.*, 2003; PONTINEN, 2000).

Além de tais discrepâncias entre essas fontes de luz, pode-se ainda mencionar a ampla variedade de diferenças de comprimento de onda, potências, densidades de energia, área de secção transversal do feixe e técnica de aplicação (CORAZZA *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2010). Sendo assim, no presente estudo, procurou-se utilizar condições que mantivessem a similaridade das variáveis existentes dos parâmetros de cada fonte de luz.

Quanto ao comprimento de onda, o *laser* utilizado nos estudos em retalhos variou de 632,8nm (SMITH *et al.*, 1992; PINFILDI *et al.*, 2005) a 904nm (ASSIS *et al.*, 2006), o que corresponde ao espectro de luz vermelho visível e infravermelho, respectivamente. Desta maneira, ASSIS *et al.* (2006) compararam os efeitos do *laser* com os dois comprimentos de onda e demonstraram melhores resultados no grupo irradiado com *laser* vermelho (670nm), sendo este o espectro utilizado na maioria dos



estudos (SMITH *et al.*, 1992; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; CURY *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010), assim como no presente estudo. Já no *LED*, o espectro de luz emitido é mais amplo em relação ao *laser*, porém, com similar concentração de energia na área de ação de ambas, mas, com distribuição diferenciada (CORAZZA *et al.*, 2007; TADA, IKEDA, TOMITA, 2009; ISSA & MANELA-AZULAY, 2010; ABLON, 2010). Portanto, como não há estudos na literatura pesquisada utilizando o *LED* na viabilidade de retalhos, o comprimento de onda utilizado no presente estudo foi baseado nos estudos de *laser* de baixa intensidade em retalhos.

Em relação à potência, os estudos com radiação *laser* em retalho cutâneo randômico utilizaram potências que variaram de 0,2mW a 100mW (KUBOTA, 2002), e a potência mais utilizada foi de 30mW. Porém, COSTA *et al.* (2010) utilizaram a terapia a *laser* de baixa intensidade em retalho cutâneo randômico, com potências de 30 e 60mW, e obtiveram melhores resultados com potência de 60mW. Assim, no presente estudo, os grupos irradiados com *laser* (G2 e G4) utilizaram a potência de 60mW, no grupo irradiado com *LED* (G3) foi utilizada a potência de 150mW, já que a área do feixe de luz do *LED* é maior em relação ao *laser*. A potência do *LED* foi maior para ajuste de densidades de energia semelhantes entre os equipamentos.

Quanto à densidade de energia, diversos foram os valores utilizados nos estudos, variando de 0,082J/cm<sup>2</sup> (SMITH *et al.*, 1992) a 185J/cm<sup>2</sup> (KUBOTA, 2002), tendo 3J/cm<sup>2</sup> a densidade de energia que mais se repete nos estudos (PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009), nos quais todos os valores utilizados tiveram resultados significantes. Alguns estudos como BOSSINI *et al.* (2009) verificaram diferentes densidades de energia no

mesmo estudo. Sendo assim, em razão da lacuna existente na literatura de *LED* em retalhos, a densidade de energia utilizada no presente estudo foi baseada nos resultados positivos de CORAZZA *et al.* (2007) que utilizaram *laser* e *LED* com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  em feridas induzidas em ratos, demonstrando resultados positivos sobre a angiogênese do tecido. Desta maneira, no presente estudo foi utilizada uma densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , tanto para o grupo irradiado com *laser* (G2) como para o grupo irradiado com *LED* (G3).

Outro fator que contribui para convergência e entendimento da quantidade de energia empregada ao tecido é o parâmetro energia total (E) que, atualmente, é discutido e analisado nos estudos com o *laser* de baixa intensidade. Quando se discute energia total ou energia, emprega-se que  $E=P$  (potência de saída W) X Tempo de aplicação, o que determina toda a energia entregue ao tecido, ou seja, representa a quantidade total de excitação que uma biomolécula pode efetivamente alcançar (CASTRO SILVA *et al.*, 2007; TUMILTY *et al.*, 2010). Mas, a energia total difere nas luzes incoerentes e coerentes, visto que existe uma menor energia por faixa espectral para o *LED* em relação ao *laser*. Por este motivo, no presente estudo utilizou-se um grupo irradiado com *laser* (G4), contendo a mesma energia total do grupo irradiado com *LED* (G3), para isto foi necessário empregar uma densidade de energia de  $89\text{J}/\text{cm}^2$  do *laser* no grupo 4.

No presente estudo, a técnica de aplicação do *laser* e do *LED* empregada foi pontual com contato, conforme utilizado na maioria dos estudos de *laser* de baixa intensidade em retalhos, e estes mostraram aumento significativo na viabilidade de retalhos (KAMI *et al.*, 1985; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009; PINFILDI *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2009;

CURY *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2010). Por outro lado, somente SMITH *et al.* (1992) não encontraram resultados significantes da radiação *laser* em retalhos cutâneos de ratos e porcos, sendo que, foi utilizada a técnica de varredura, em que a radiação *laser* é aplicada sem contato com a pele, dificultando a absorção, penetração e irradiação de tecidos profundos. Desta maneira, a aplicação do *laser* em contato com a superfície da pele durante a radiação aumenta a profundidade de penetração pela redução da reflexão e dispersão de energia (GREATHOUSE, CURRIER, GILMORE, 1985; LAAKSO, RICHARDSON, CRAMOND, 1993; BAXTER, 1997).

Quanto ao local de irradiação, diversos estudos realizaram 24 pontos de radiação do *laser* sobre e ao redor do retalho, demonstrando resultados significantes na diminuição da área de necrose dos grupos irradiados em relação ao controle (PINFILDI *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009, COSTA *et al.* 2010). Além disso, PINFILDI *et al.* (2005) avaliaram técnicas de aplicação do *laser* em retalhos, e, o melhor resultado na diminuição da área de necrose foi com a radiação *laser* em 54 pontos sobre e ao redor do retalho. Outros trabalhos utilizaram técnicas diferentes, incluindo o estudo de KAMI *et al.* (1985), em que a radiação *laser* foi aplicada em 18 pontos, e de KUBOTA (2002) onde a radiação *laser* foi realizada em um único ponto sobre o pedículo do retalho axial. Em ambos os estudos, foram encontrados resultados significantes em relação à perfusão vascular, mas não foi possível a comparação entre eles pela falta de consistência em ambas as técnicas e nos parâmetros do *laser* utilizado.

No entanto, a irradiação em vários pontos sobre e ao redor do retalho pode ser um fator limitante na prática clínica, pela variabilidade nas dimensões de retalhos realizados, inviabilizando o tempo de tratamento.

Assim, no presente estudo, a radiação *laser* foi aplicada em 1 ponto, a 2,5cm da base cranial do retalho cutâneo, baseando-se nos estudos de ASSIS *et al.* (2006), PRADO *et al.* (2006) e PRADO *et al.* (2009). O estudo de PRADO *et al.* (2009) teve como objetivo encontrar o local mais efetivo para a radiação *laser* em retalhos cutâneos, a radiação *laser* foi realizada em 1 ponto a 5cm da base cranial do retalho; 2 pontos (5 e 7,5cm); 3 pontos (2,5, 5 e 7,5cm); e em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho, foi obtida uma diminuição significativa na porcentagem da área de necrose no grupo irradiado em 1 ponto a 2,5cm da base cranial do retalho, porém, foi utilizado o *laser* com comprimento de onda de 830nm (AsGaAl).

Em relação ao número de aplicações, no presente estudo, os grupos experimentais foram irradiados durante 5 dias consecutivos, sendo imediatamente após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes, assim como KAMI *et al.* (1985), AMIR *et al.* (2000), PINFILDI *et al.* (2005), PRADO *et al.* (2005), ASSIS *et al.* (2005), PRADO *et al.* (2006), PRADO *et al.* (2009), BOSSINI *et al.* (2009), CURY *et al.* (2009), COSTA *et al.* (2010), e PRADO *et al.*, (2010) que obtiveram resultados significantes quanto o aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico.

No presente estudo, as avaliações macroscópicas de necrose e microscópicas de densidade vascular e dos mastócitos foram realizadas no 7º dia pós-operatório devido aos sinais de necrose do retalho serem evidentes entre os 3º e 4º dias, sendo seu limiar final de necrose entre 7 a 10 dias (MCFARLANE; DE YOUNG; HENRY, 1965). Diferentemente dos estudos realizados por SMITH *et al.* (1992) e KUBOTA & OSHIRO (1996) onde as avaliações macroscópicas foram realizadas no 5º dia após o ato operatório. Já HARDER *et al.* (2004) realizaram um estudo sobre a

evolução do tecido isquêmico, observaram que no 7º dia pós-operatório em ratos não se observa mais sinais de neovascularização, quando não for utilizado nenhum tipo de terapia.

Para avaliação macroscópica da eficácia de métodos com finalidades terapêuticas, SASAKI & PANG (1980), descreveram um método para quantificar a área de necrose tecidual de retalhos cutâneos randômicos, com a utilização de papel vegetal, grafite e balança de precisão. O método tem vantagens pela facilidade de utilização e custo, sendo utilizado em diversos estudos, mostrando ser um método eficaz e confiável (SASAKI & PANG, 1980; LIEBANO *et al.*, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; PRADO *et al.* 2009; BOSSINI *et al.* 2009; CURY *et al.* 2009; PRADO *et al.*, 2010).

No presente estudo, o método empregado por SANO *et al.* (2001) foi utilizado; estes autores compararam o método-padrão de avaliação da viabilidade do TRAM com um novo método de avaliação por computador; para este foi empregado o gabarito de papel, escaneado eletronicamente e salvo em bitmap (.bmp) para análise da área de necrose com o *software* Adobe Photoshop 6.0. O método computadorizado mostrou que a porcentagem de viabilidade foi ligeiramente maior quando comparada ao método-padrão, porém, não houve diferença significativa. A utilização do método computadorizado evita pequenos erros na demarcação dos limites do retalho, porém, segundo os autores, esses pequenos erros não fazem diferença significativa no momento da aferição. O método de avaliação computadorizado também foi utilizado em modelo de retalho cutâneo randômico no estudo de COSTA *et al.* (2010).

Para avaliação microscópica, no presente estudo foi realizada a coleta das amostras dos retalhos cutâneos de todos os animais no 7º dia

pós-operatório, para a avaliação da densidade vascular e dos mastócitos, com intuito de fornecer dados adicionais sobre a viabilidade dos retalhos. Foram retirados dois fragmentos de pele do retalho, a amostra A foi retirada do local de radiação do *laser* e a amostra B, da linha de transição entre o tecido viável e o tecido necrótico. Assim como BOSSINI *et al.* (2009), que retiraram uma amostra de 2cm<sup>2</sup> incluindo tecido viável e a linha de transição do tecido viável e necrótico de cada retalho para contagem total de vasos. Mas, no presente estudo, as amostras foram avaliadas de modo independente, o que tornou possível a comparação, tanto da densidade vascular como dos mastócitos entre as amostras de pele, conforme a área de viabilidade do retalho, mostrando resultados importantes em relação aos efeitos das fontes de luz sobre o tecido da região distal do retalho cutâneo randômico.

Para esta análise, utilizou-se o método morfométrico bidimensional para quantificar a densidade vascular e exocitose dos mastócitos, sendo este o mesmo método utilizado no estudo de COSTA *et al.* (2010) em que foi demonstrada a eficácia na representação do aumento do número de vasos em retalhos cutâneos randômicos em ratos. Este método foi utilizado em outros estudos, como de BARTHE *et al.* (1991) na análise da vascularização de pele de retalhos em coelhos, VÖLKER *et al.* (2008), na análise morfométrica nas fibras colágenas em peles de pacientes com dissecação espontânea da artéria cervical e CHERETIS *et al.* (2008) que utilizaram a morfometria para detectar a recidiva de células de carcinoma basal.

No presente estudo, a média da porcentagem de área de necrose do retalho no grupo 1 (simulação) foi de 28,70%. No grupo 2 (*Laser* 0,14J), em que os animais foram submetidos à radiação *laser* com densidade de

energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , a média de porcentagem de necrose foi de 22,07%. No grupo 3 (*LED* 2,49J), em que os animais foram submetidos à radiação *LED* com densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , a média de porcentagem de necrose foi de 14,08% e no grupo 4 (*Laser* 2,49J), em que os animais foram submetidos à radiação *laser* com densidade de energia de  $89\text{J}/\text{cm}^2$ , a média de porcentagem de necrose foi de 14,03%.

Assim, a média obtida no grupo 1 (simulação) do presente estudo mostrou-se dentro do limite de porcentagem de necrose descrito por MCFARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965), em que se preconiza uma variação de 25% a 50% de necrose a partir de sua porção distal. Por outro lado, no estudo de PRADO *et al.* (2005) que utilizaram o método de aplicação da radiação *laser* similar ao do presente estudo foi obtida uma média de 48,86% no grupo controle. Além disso, outros estudos que utilizaram *laser* em retalhos obtiveram uma maior porcentagem de área de necrose nos grupos controle em relação ao do presente estudo. Essa diferença pode ter ocorrido devido à curva de aprendizado da técnica operatória empregada.

Na análise estatística do presente estudo, a porcentagem da área de necrose do retalho foi menor nos grupos irradiados comparados com o grupo 1 (simulação). Na análise estatística, em relação ao grupo 1, somente foram obtidas diferenças significantes dos grupos 3 (*LED* 2,49J) e 4 (*Laser* 2,49J), tendo estes, a mesma energia total depositada no tecido. Também foram verificadas diferenças significantes do grupo 2 (*Laser* 0,14J) em relação aos grupo 3 e 4, sendo que os maiores valores de necrose foram notados no grupo 2; no entanto, quando comparados os grupo 2 com o 1 foram obtidos menores valores de necrose no grupo 2, porém, sem diferença significativa.

Sendo assim, um fator determinante para este resultado foi a energia total, já que no grupo 2 foi utilizada uma energia total de 0,14J, considerada uma energia baixa em relação aos grupo 3 e 4; para estes foi utilizada uma energia total de 2,49J. Apesar da diferença de energia total entre os grupos 2 e 3, foi utilizada para ambos a mesma densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , esta diferença ocorreu devido ao grupo 3 ter sido irradiado pelo *LED*, que permite uma área de secção transversal do feixe e uma potência maior do que o *laser* utilizado, o que proporciona maior energia total.

A diferença de porcentagem de área de necrose entre os grupos 2 (*Laser* 0,14J) e 3 (*LED* 2,49J) é de extrema valia para a literatura, pois, estes dados demonstram que as fontes de luz *laser* e *LED* somente são comparáveis, se forem utilizadas as mesmas energias totais e não densidades de energia. Diferente dos estudos de MORAIS *et al.* (2010) que avaliaram o efeito do *laser* e do *LED* de baixa intensidade com a mesma densidade de energia ( $2,5\text{J}/\text{cm}^2$ ) sobre a formação de edema, aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia articular na artrite induzida em ratos, da mesma maneira, CORAZZA *et al.* (2007) investigaram os efeitos do *laser* e do *LED* em feridas induzidas em ratos, utilizando somente a mesma densidade de energia ( $5\text{J}/\text{cm}^2$ ). Assim, esses estudos compararam o *laser* e o *LED*, mesmo com parâmetros diferentes, como potência e área de secção transversal do feixe, o que leva a uma energia total entregue ao tecido diferente para cada fonte de luz.

Em relação à quantidade de vasos sanguíneos, há estudos que demonstram que o *laser* de baixa intensidade aumenta o fluxo sanguíneo na microcirculação, em razão do aumento da liberação de óxido nítrico no local irradiado, sendo este um potente vasodilatador (BAXTER, 1991;



WILDEN & KARTHEIN, 1998; FILLIPIN *et al.*, 2005). Além disso, pode promover a liberação e secreção de fatores de crescimento relacionados à angiogênese (KIPSHIDZE *et al.*, 2001), possibilitando, o fornecimento de oxigênio e nutrientes mais adequados para atender às necessidades da fase proliferativa do processo de reparo tecidual (KITCHEN & BAZIN 1996; SCHINDL *et al.*, 1999).

Desta maneira, no presente estudo foi analisada a densidade vascular, por meio da coloração de hematoxilina e eosina, e não houve diferença significativa entre os grupos na amostra A (tecido viável), o que difere dos estudos de COSTA *et al.*(2010) e BOSSINI *et al.* (2009), estes, observaram aumento significativo na densidade vascular nos grupos com radiação *laser* comparados com o controle, com densidades de energia variando de 3J/cm<sup>2</sup> a 24J/cm<sup>2</sup>. No entanto, no presente estudo, foram observados valores de média maiores no grupo 4 (28,58), grupo 3 (28,91) e grupo 2 (25,75) em relação ao grupo 1 simulação (22).

Na amostra B (linha de transição), houve aumento significativo da densidade vascular no grupo 3 (*LED* 2,49J) em relação ao grupo 1 (simulação), o que demonstra maior propagação dos efeitos do *LED* em relação ao *laser* sobre o retalho cutâneo, uma vez que a amostra B foi retirada da linha de transição do retalho, ou seja, em uma área mais distal em relação à amostra A, contendo um menor suprimento sanguíneo por estar próxima à necrose do retalho.

As amostras A (tecido viável) e B (linha de transição) de cada grupo foram comparadas, com o intuito de verificar se houve diferença na densidade vascular, de acordo com a viabilidade do retalho. Assim, somente no grupo 1 (simulação) observou-se diferença significativa entre as amostras, e a amostra A (22) obteve uma média maior do que a B (13,41).

Estes dados indicam que houve uma diminuição dos vasos sanguíneos na área mais distal do retalho, onde o tecido está iniciando o processo de necrose. No entanto, nos grupos irradiados, houve uma discreta diminuição na densidade vascular na amostra B, porém, sem diferença significativa, indicando que tanto o *laser* como o *LED* com os parâmetros utilizados modificaram a evolução do processo de necrose tecidual. Mas, não existem estudos que observaram a densidade vascular somente na linha de transição do retalho, não sendo possível a comparação dos resultados do presente estudo.

Em relação à exocitose de mastócitos, estes são sensíveis à IgE específico e quando entram em contato, estimulam a liberação de mediadores químicos situados em vesículas dentro dos mastócitos (degranulação), como a serotonina, heparina e histamina (HARVIMA, NILSSON, NAUKKARINEN, 2010; CRIVELLATO & RIBATTI, 2010). Tanto a serotonina como a histamina possuem propriedades vasoativas que são muito importantes para a melhora da perfusão vascular (LINDSTEDT & KOVANEN, 2006). Assim, há estudos que demonstram a interação da radiação *laser* com os mastócitos, obtendo um aumento da quantidade e degranulação dessas células, após o uso do *laser* de baixa intensidade (EL SAYED & DYSON, 1990; EL SAYED & DYSON, 1996; VASHEGHANI *et al.*, 2008). PEREIRA *et al.* (2010) avaliaram a ação da terapia a *laser* de baixa intensidade (670 nm) sobre os mastócitos e as respostas vasculares, nos modelos de feridas excisionais realizadas em ratos, foram observados níveis elevados de VEGF no momento em que a degranulação de mastócitos foi mais evidente. Em pequenas concentrações, o VEGF pode ser mais potente que a histamina na indução de permeabilidade vascular

(NORBY, 2002), além ajudar na formação do lúmen do novo vaso (LEVI-SCHAFFER & PE'ER, 2001).

No presente estudo, a exocitose de mastócitos foi avaliada com intuito de correlacionar com o aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a viabilidade do retalho cutâneo. Para esta análise, foi utilizada a coloração de Azul de Toluidina, específica para demarcação de mastócitos, que os deixam com a coloração azul escuro e de fácil visualização para morfometria (EL SAYED & DYSON, 1996).

Porém, não há na literatura pesquisada estudos que tenham avaliado a quantidade de mastócitos em retalhos cutâneos randômicos. No entanto, PINFILDI *et al.* (2009) observaram aumento significativo do número de mastócitos em todos os grupos irradiados com *laser* em relação ao controle. No entanto, este estudo foi realizado em modelo TRAM, o que não torna possível a comparação entre os dados do presente estudo. Assim, é importante ressaltar que, no presente estudo, embora não tenha mostrado diferença significativa do número de mastócitos entre os grupos na amostra A (tecido viável), somente no grupo 3 (*LED* 2,49J) foi obtida maior média em relação ao grupo 1 (simulação).

No entanto, na amostra B (linha de transição), foram encontradas diferenças significantes do grupo 1 (simulação) em relação ao grupo 3 (*LED* 2,49J), mostrando maiores médias no grupo 3, ou seja, a radiação *LED* levou ao aumento do número de mastócitos na região distal do retalho cutâneo randômico.

Os resultados do presente estudo mostram lacunas importantes em relação ao efeito sistêmico do *laser* e do *LED*. No entanto, não há na literatura pesquisada estudos que tenham investigado tal efeito, deixando, assim, uma hipótese relacionada ao aumento do número de vasos e

mastócitos na amostra B (linha de transição) e uma perspectiva importante para o esclarecimento de possíveis mecanismos. Como complemento a esta hipótese, no presente estudo, a amostra B (linha de transição) do grupo 1 (simulação) apresentou uma diminuição no número de vasos e mastócitos comparado com a amostra A (área viável), demonstrando que os grupos irradiados com *laser* e *LED* tiveram efeitos sistêmicos sobre o retalho cutâneo randômico. Estudos a respeito de efeitos sistêmicos com controle do próprio animal seriam de extrema importância para elucidar os mecanismos pelo qual o efeito sistêmico ocorre.

Assim como no presente estudo, KUBOTA & OHSHIRO (1996); AMIR *et al.* (2002); KUBOTA (2002); PRADO *et al.* (2005); ASSIS *et al.* (2006) irradiaram retalhos com apenas 1 ponto de aplicação, na tentativa de estimular a região proximal em retalhos cutâneos randômicos, que no ato operatório, não sofre nenhum tipo de dissecação de vasos permanecendo a vascularização íntegra para lhe dar suporte sanguíneo. Esses estudos encontraram resultados significantes, sem comparações entre outros parâmetros, e sim somente em relação à técnica de aplicação.

Este fato é de suma importância para a relevância clínica, já que os resultados mostram que as técnicas de aplicação fazem diferença sobre viabilidade do retalho, pelo tempo de aplicação, quantidade de pontos e local da aplicação, e somente a utilização do *laser* ou do *LED* em apenas 1 ponto no retalho cutâneo randômico é o suficiente para estimular um aporte sanguíneo melhor, levando em consideração diferentes energias totais e tipos de fonte de luz utilizada.

No entanto, apesar dos resultados positivos das fontes de luz *laser* e *LED*, há uma lacuna em relação à padronização de parâmetros, sobretudo em relação à energia total entregue ao tecido, parâmetro escolhido pelo

presente estudo para investigação. Além disso, estudos futuros podem ser realizados com outras avaliações como óxido nítrico associado às alterações celulares com VEGF, cálcio intracelular relacionando apoptose celular e outros fatores de crescimento associados aos fibroblastos (WEBB, DYSON, LEWIS, 1998) que fazem parte do complexo ciclo angiogênese e necrose tecidual.

Assim, mais pesquisas são necessárias com o objetivo de esclarecer dúvidas relacionadas à utilização do *laser* e do *LED* com parâmetros diferentes, que são importantes fontes de pesquisas e de divergência entre os estudos.

**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

A terapia a *laser* de baixa intensidade e diodo emissor de luz com as mesmas energias totais foram eficientes no aumento da viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.

## **REFERÊNCIAS**



## 8. REFERÊNCIAS

Abla LE, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta. Cir. Bras.* 2005;20(2):121-3.

Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):141-6.

Abramovits W, Arrazola P, Gupta AK. Light-emitting diode-based therapy. *Skinmed.* 2005;4(1):38-41.

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

Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg.* 2003;21(5):249-58.

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.

Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leuk Lymphoma.* 2000;40(1-2):157-66.

Asai S, Fukuta K, Torii S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. *Ann. Plast. Surg.* 1997;38(5):514-7.

Assis LR, Marcolino AM, Pinfildi CE, Prado RP, Ferreira LM. Comparison of the 904nm and 670nm diode laser in the viability of random skin flap in rats. *Fisioter. Bras.* 2006;7(1):36-9.

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

Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008 Dec;27(4):227-38.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995;16(4):331-42.

Baxter GD, Bell AJ, Allen JM, Ravey J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy.* 1991;77(3):171-8.

Bertoloni G, Sacchetto R, Baro E, Ceccherelli F, Jori G. Biochemical and morphological changes in *Escheichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. *J Photochem Photobiol B.* 1993;18(2-3):191-6.

Bihari I, Mester A. The biostimulative effect of low level laser therapy of long-standary crural ulcer using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers and non coherent light: Preliminary report of a randomized double bind comparative study. *Laser Therapy.* 1989;37:187-89.

Biondo-Simões MLP, Greca FH, Paula JB, Chin EWK, Santos EAA, Stalhschmidt FL. Influencia do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos - estudo experimental em ratos. *Acta. Cir. Bras.* 2000;15(1)(3):36-40.

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.

Boulton M, Marshall J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. *Lasers in the Life Science*. 1986;1:125-34

Castro-e-Silva T, Castro-e-Silva O, Kurachi C, Ferreira J, Zucoloto S, Bagnato VS. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(8):1065-9.

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.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(2):102-6.

Costa MS, Pinfieldi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy with output power of 30mW and 60mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):57-61.

Crivellato E, Ribatti D. The mast cell: an evolutionary perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2010;85(2):347-60.

Cury V, Bossini PS, Fangel R, Crusca Jde S, Renno AC, Parizotto NA. The Effects of 660nm and 780nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):27-32.

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

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

Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg.* 1993;31(4):352-7.

Eells JT, Wong-Riley MT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):559-67.

El Sayed SO, Dyson M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin, *Lasers Surg Med.* 1990;10(6):559-68.

El Sayed SO, Dyson M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers Surg Med.* 1996;19(4):433-7.

Ely PB, Ferreira LM. Transverse rectus abdominis musculocutaneous flap (TRAM flap) – experimental model in rats. *Acta Cir Bras.* 2003;18:46-53.

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, Laredo Filho J, Ramos RR. Retalho fásio-cutâneo axial na reparação de perdas de substâncias da perna. *F Med.* 1986;93(4):261-4.

Ferreira LM; Andrews JM, Laredo Filho J. Retalho fasciocutâneo de base distal: estudo anatômico e aplicação clínica nas lesões do terço inferior da perna e tornozelo. *Rev Bras Ortop.* 1987;22(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 fásquio-cutâneo Cross-leg. *F Med*. 1988;97(2):95-7.

Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, Marroni NP, Gallego JG. Low level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers Surg Med*. 2005;37(4):293-300.

Freire ST, Ferreira LM, Gomes HC, Percário S. Uric acid as a monitor of oxidative stress in a random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2003;18(6):502-8.

Gherardini G, Lundeberg T, Cui JG, 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.

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

Harashima T, Sawada Y, Watanabe S. The relationship between venous occlusion time in island flaps and flap survivals. *Plast Reconst Surg*. 1977;60(1)92-95.

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.

Harvima IT, Nilsson G, Naukkarinen A. Role of mast cells and sensory nerves in skin inflammation. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010;145(2):195-204.

Hode L. The importance of the coherency. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(4):431-4.

Huang PJ, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. in vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(3):183-90

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

Issa MC, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol.* 2010 ;85(4):501-11

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

Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg.* 1981;116(3):293-6.

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.

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

Kipshidze N, Nikolaychik V, Muckerheidi M, Keelan MH, Chekanov V, Maternowski M, Chawla P, Hernandez I, Iyer S, Dangas G, Sahota H, Leon MB, Roubin G, Moses JW. Effect of short pulsed nonablative infrared laser irradiation on vascular cells in vitro and neointimal hyperplasia in a rabbit balloon injury model. *Circulation.* 2001;104(15):1850-5.

Kitchen S, Bazin S. *Eletroterapia de Clayton.* 10. ed. São Paulo: Manole. 1998. 350p

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

- Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischemic musculocutaneous flaps. *Acta Physiol Scand.* 1988;134(1):95-9.
- Komine N, Ikeda K, Tada K, Hashimoto N, Sugimoto N, Tomita K. Activation of the extracellular signal-regulated kinase signal pathway by light emitting diode irradiation. *Lasers Med Sci.* 2010;25(4):531-7.
- Körlof B, Ugland O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with complamin and with dicoumarol: animal experiments. *Acta Chir Scand.* 1966;131(5):408-12.
- Krag C, Taudorf U, Siim E, Bolund S. The effect of pulsed electromagnetic energy (Diapulse) on the survival of experimental skin flaps. A study on rats. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1979;13(3):377-80.
- Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Laser Med Sci.* 2002;17(3):146-53.
- Kubota J, Ohshiro T. The effects of diode laser LLLT on flap survival: measurement of flap microcirculation with laser speckle flowmetry. *Laser Ther.* 1996;8:241-6.
- Laakso L, Richardson C, Cramond T. Factors affecting low level laser therapy. *Australian J Physiother.* 1993; 39(2):87-92.
- Levi-Schaffer F, Pe'er J. Mast cells and angiogenesis. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(4):521-4.
- Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Can J Plast Surg.* 2002;10:151-4.
- Lindstedt KA, Kovanen PT. Isolation of mast cell granules. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006 Jan;Chapter 3:Unit 3.16.

- Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med.* 1998;23(5):291-8.
- Lundeberg T, Kjartansson J, Samuelsson U. Effect of electrical nerve stimulation on healing of ischemic skin flaps. *Lancet.* 1988;24(8613):712-4.
- Lundeberg T, Malm M. Low power HeNe laser treatment of venous leg ulcers. *Ann Plast Surg.* 1991;27(6):537-9.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers 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.
- Morais NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, Zamuner SR. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):227-32.
- Niina Y, 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(3-4):273-80.
- Norby K. Mast cells and angiogenesis, *APMIS.* 2002;110(5):355-71.
- Ohshiro T, Fujino T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. *Keio J Med.* 1993;42(4):191-5.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(3):291-325.



- Pereira MC, de Pinho CB, Medrado AR, Andrade Zde A, Reis SR. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B*. 2010;98(3):188-92.
- Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, 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 of low-level laser therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):337-43.
- Pontinen PJ, Aaltokallio T, Kolari PJ. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl Diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. *Acupunct Electrother Res*. 1996;21(2):105-18.
- Pontinen P. Lasers in Medicine and Dentistry. Part One: Basic Science, and Up-to-date Clinical Application of Low Energy-Laser Laser Therapy LLLT. Laseracupuncture. In: Simunovic Z. 2000;455-75.
- Prado RP; Ferreira LM, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE. Diode Laser in viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(1):89-151.
- Prado R, Neves L, Marcolino A, Ribeiro T, Pinfildi C, Ferreira L, Thomazini J, Piccinato C. Effect of low-level laser therapy on malondialdehyde concentration in random cutaneous flap viability. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):379-84.
- 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*. 2009;27(3):411-6.

- 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.
- Sagi A, Ferder M, Levens D, Strauch B. Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. *Plast Reconst Surg.* 1986;77(4):639-44.
- Salmi AM, Hong C, Futrell JW. 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 Surg 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, 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.
- Schanaider A, Oliveira AA, Costa IR, Leite GLS, Considera DP, Lopes AKP, Silva AR. Mannitol in reperfusion skin island flaps injury. *Acta. Cir. Bras.* 1999;14(3):135-41.
- Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: A review. *J Investig Med.* 2000;48(5):312-26.
- Schindl A, Schindl M, Schindl L, Jureka W, Honigsmann H, Breier F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40(3):481-4.

- Schindl A, Schindl M, Schon H, Knobler R, Havelec L, Schindl L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes Care*. 1998;21(4):580–584.
- Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):17-21.
- 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.
- Stranc MF, Sowa MG, Abdulrauf B, Mantsch HH. Assessment of tissue viability using near-infrared spectroscopy. *Br J Plast Surg*. 1998;51(3):210-7.
- Tada K, Ikeda K, Tomita K. Effect of polarized light emitting diode irradiation on wound healing. *J Trauma*. 2009;67(5):1073-9.
- Trelles MA, Allones I, Mayo E. Combined visible light and infrared light-emitting diode (LED) therapy enhances wound healing after laser ablative resurfacing of photodamaged facial skin. *Med Laser Appl*. 2006;21(3):165-75.
- Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD. Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg*. 2010 Feb;28(1):3-16.
- Tyner TR, Tong W, Donovan K, McDonald T, Sian K, Yamaguchi KT. Dichloroacetate reduces tissue necrosis in a rat tranverse rectus abdominis musculocutaneous flap model. *Ann Plast Surg*. 2006;56(3):320-6.
- Vasheghani MM, Bayat M, Rezaei F, Bayat A, Karimipour M. Effect of Low-Level Laser Therapy on Mast Cells in Second-Degree Burns in Rats. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):1-5.

- Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Laser Med Sci.* 2003;18(2):95-9.
- 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: 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(5):294-301.
- Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA. Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: clinical, histologic, and surface profilometric results. *Laser Surg Med.* 2005;36(2):85-91.
- Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Sur.* 2003;21(2):67-74.
- Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;16(3):159-65.
- Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport.* 2001;12(14):3033-7.
- Yang D, Morris SF. An extended dorsal island skin flap with multiple vascular territories in the rat: A new skin flap model. *J Surg Res* 1999;87(2):164-70.

**NORMAS ADOTADAS**

## **NORMAS ADOTADAS**

A.C.L.A.M – *American College of Laboratory Animal Medicine* - Princípios éticos da experimentação animal. Disponível em: <http://www.aclam.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>.

Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> – terminologia em saúde.

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia anatômica Internacional. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.

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 Reparadora UNIFESP-EPM. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008.

Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo: 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

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

International committee on veterinary gross anatomical nomenclature - Nomina anatômica veterinária. 3.ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

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

## ABSTRACT

**Introduction:** The skin flap is a common surgical procedure in plastic surgery, is the main complication of necrosis formation. Thus, several studies have used low level laser therapy to increase flap survival. Currently, LEDs have been introduced as an alternative to laser light.

**Objective:** To evaluate the effect of low level laser therapy and light emitting diode on the viability of random skin flap in rats.

**Materials and methods:** We used 48 animals divided into four groups, in all animals was performed random skin flap (4x10cm): group 1 sham; group 2 laser radiation 660nm, with energy density 5J/cm<sup>2</sup>; group 3 radiation LED 630nm, 5J/cm<sup>2</sup> and Group 4 laser radiation 660nm, 89J/cm<sup>2</sup>. The irradiation was performed after surgery and 4 days subsequent to a point 2.5 cm from the cranial base of the flap. On the 7th postoperative day was evaluated vascular density, mast cell numbers and percentage of necrotic area.

**Results:** The percentage of necrosis was significantly lower in group 3 (14.08%) and group 4 (14.03%) than in group 1 (28.70%) and group 2 (22.7%) with  $p < 0.05$ . Vascular density and mast cell numbers, only the animals in group 3 had increased significantly compared to group 1 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The low level laser therapy and light emitting diode with the same total energies were effective in increasing the viability of random skin flaps in rats.



## APÊNDICE 1 – Aceite do Comitê de ética em Pesquisa.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de agosto de 2008.  
CEP 1104/08

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) MICHELE AKEMI NISHIOKA  
Co-Investigadores: Lydia Masako Ferreira (orientador), Heltor Francisco de Carvalho Gomes, Carlos Eduardo Pinfidi,  
Michele Akemi Nishioka  
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: "Terapia a laser de baixa intensidade e diodo emissor de luz (LED) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria B - estudo crônico.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica.

**OBJETIVOS:** Avaliar a influência da terapia a laser de baixa intensidade e Diodo emissor de luz (LED) na viabilidade do retalho cutâneo em ratos..

**RESUMO:** Estudo com ratos Wistar. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: tramadol. Eutanásia: hiperdosagem de anestésico. Serão constituídos 4 grupos com 12 animais cada, sendo que todos os animais serão submetidos ao retalho cutâneo randômico. Grupo 1- simulação da irradiação laser com equipamento desligado; 2- radiação laser de 685nm, com 30 mW de potência e densidade de energia 5J/cm<sup>2</sup>, um minuto após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes; 3- radiação LED de 630nm, com 200 mW de potência e densidade de energia de 5J/cm<sup>2</sup>, um minuto após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes; 4- radiação laser de 685nm com 30 mW de potência e densidade de energia 89J/cm<sup>2</sup>, um minuto após o ato operatório e nos 4 dias subsequentes. Será realizado retalho cutâneo randômico dorsal. Os tratamentos com a radiação laser e LED serão realizadas em 24 pontos, distribuídos sobre e ao redor de retalho cutâneo randômico, de base cranial. A análise macroscópica será feita pelo método do gabarito de papel no 7º dia após o ato operatório, para quantificar a porcentagem de necrose, utilizando papel transparente e balança de precisão. Os animais serão sacrificados, os fragmentos retirados para análise histológica. Será realizada reação imunohistoquímica para alfa actina, antígeno CD34 e antígeno Ki67..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Devido às diferenças de LED e laser relacionadas às variáveis de luz, este trabalho visa avaliar os resultados entre os dois tipos de tratamentos propostos..

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos a serem realizados, estando este projeto inserido na linha de pesquisa do orientador..

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 14143,79.

## APÊNDICE 1 – Aceite do Comitê de ética em Pesquisa.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 27/7/2009 e 27/7/2010.

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

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** – Análise estatística da distribuição normal dos dados da porcentagem da área de necrose.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	36.96	2.40	5.37	7.91
R2	36.96	29.17	17.36	10.74
R3	26.70	24.92	17.65	16.22
R4	22.67	5.46	20.69	27.46
R5	23.77	14.59	1.06	13.54
R6	23.03	28.43	17.00	14.77
R7	24.81	24.76	10.47	4.67
R8	32.65	27.01	8.05	24.43
R9	19.95	23.99	13.08	14.56
R10	41.46	27.25	25.19	12.53
R11	19.42	21.54	19.75	8.93
R12	36.06	35.33	13.35	12.68
Média	28.70	22.07	14.08	14.03
Mediana	23.92	26.59	13.73	9.72
Teste Kolmogorov Smirnov			p valor = 0,97	

**APÊNDICE 3** – Análise estatística da distribuição normal dos dados de densidade vascular da amostra A.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	31	36	38	24
R2	22	38	39	22
R3	24	16	25	12
R4	24	20	40	30
R5	25	34	25	28
R6	12	37	26	27
R7	24	26	36	32
R8	20	21	22	36
R9	25	25	24	46
R10	26	24	21	36
R11	20	15	19	37
R12	11	17	32	13
Média	22	25,75	28,91	28,58
Mediana	18	31,5	31	29,5
Teste Kolmogorov Smirnov			p valor = 0,30	

**APÊNDICE 3**– Análise estatística da distribuição normal dos dados de densidade vascular da amostra B.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	6	10	25	59
R2	2	5	14	12
R3	17	19	19	1
R4	10	56	46	15
R5	34	27	28	38
R6	17	14	41	34
R7	26	11	34	16
R8	8	41	45	14
R9	10	29	22	33
R10	23	22	25	11
R11	2	21	45	40
R12	6	28	12	55
Média	13,41	23,58	29,66	27,33
Mediana	21,5	12,5	37,5	25
Teste Kolmogorov Smirnov			p valor = 0,67	

**APÊNDICE 4** – Análise estatística da distribuição normal dos dados da exocitose de mastócitos da amostra A.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	14	9	20	16
R2	10	16	6	13
R3	14	0	18	6
R4	9	10	15	17
R5	27	15	18	9
R6	11	14	20	4
R7	13	16	6	13
R8	11	1	13	11
R9	10	6	17	7
R10	19	2	12	13
R11	9	5	11	17
R12	0	11	12	16
Média	12.5	8.75	14	11.83
Mediana	12	15	13	8.5
Teste Kolmogorov Smirnov			p valor = 0,87	

**APÊNDICE 4** – Análise estatística da distribuição normal dos dados da exocitose de mastócitos da amostra B.

<b>Animal</b>	<b>Grupo 1 (Controle)</b>	<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>	<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>	<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>
R1	7	8	12	5
R2	2	9	3	7
R3	3	1	5	3
R4	2	2	7	4
R5	3	3	6	3
R6	9	3	2	4
R7	2	1	5	11
R8	1	1	5	7
R9	4	4	4	5
R10	2	5	6	4
R11	1	2	10	5
R12	3	5	11	2
Média	3,25	3,66	6,33	5
Mediana	5,5	2	3,5	7,5
Teste Kolmogorov Smirnov			p valor = 0,13	

**APÊNDICE 5**– Análise estatística da comparação entre os avaliadores da variável porcentagem da área de necrose.

Animal	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>	
	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2
R1	36,96	37,26	2,40	1,93	5,37	8,99	7,91	5,84
R2	36,96	37,29	29,17	29,70	17,36	10,91	10,74	17,01
R3	26,70	26,71	24,92	24,30	17,65	16,34	16,22	17,98
R4	22,67	22,99	5,46	5,02	20,69	26,57	27,46	20,79
R5	23,77	23,49	14,59	14,17	1,06	13,13	13,54	1,25
R6	23,03	23,26	28,43	28,30	17,00	14,48	14,77	16,93
R7	24,81	25,53	24,76	24,85	10,47	4	4,67	10,84
R8	32,65	32,79	27,01	27,41	8,05	24,62	24,43	8,69
R9	19,95	19,65	23,99	23,63	13,08	14,59	14,56	13,30
R10	41,46	40	27,25	27,81	25,19	12,83	12,53	25,34
R11	19,42	19,20	21,54	21,82	19,75	8,82	8,93	19,84
R12	36,06	36	35,33	35,55	13,35	12,14	12,68	13,85
Média	28,70	28,68	22,07	22,04	14,08	13,70	14,03	14,30
Mediana	23,92	23,92	26,59	26,57	13,73	9,24	9,72	13,88
Valor p	0,586		0,674		0,39		0,438	

Teste T pareado  $p \leq 0,05$



**APÊNDICE 6** – Análise estatística da comparação entre os avaliadores da variável densidade vascular da amostra A.

	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>	
<b>Animal</b>	<b>Aval 1</b>	<b>Aval 2</b>	<b>Aval 1</b>	<b>Aval 2</b>	<b>Aval 1</b>	<b>Aval 2</b>	<b>Aval 1</b>	<b>Aval 2</b>
R1	31	32	36	35	38	39	24	25
R2	22	23	38	38	39	39	22	22
R3	24	24	16	16	25	26	12	11
R4	24	24	20	20	40	40	30	30
R5	25	26	34	34	25	25	28	28
R6	12	13	37	36	26	25	27	28
R7	24	24	26	26	36	36	32	32
R8	20	20	21	22	22	21	36	36
R9	25	24	25	25	24	24	46	45
R10	26	26	24	23	21	20	36	37
R11	20	20	15	15	19	18	37	37
R12	11	10	17	18	132	33	13	14
Média	22	22,16	25,75	25,66	28,91	28,83	28,58	28,75
Mediana	18	18,5	31,5	31	31	30,5	29,5	30
Valor p	0,44		0,67		0,72		0,44	

Teste T pareado  $p \leq 0,05$

**APÊNDICE 7 – Análise estatística da comparação entre os avaliadores da variável densidade vascular da amostra B.**

Animal	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>	
	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2
R1	6	5	10	11	25	26	59	58
R2	2	3	5	5	14	14	12	11
R3	17	17	19	18	19	19	1	2
R4	10	11	56	56	46	45	15	15
R5	34	34	27	28	28	28	38	39
R6	17	18	14	14	41	42	34	34
R7	26	26	11	12	34	34	16	17
R8	8	9	41	41	45	46	14	14
R9	10	10	29	30	22	22	33	33
R10	23	22	22	22	25	24	11	10
R11	2	2	21	21	45	45	40	40
R12	6	6	28	27	12	13	55	54
Média	13,41	13,58	23,58	23,75	29,66	29,83	27,33	27,25
Mediana	21,5	22	12,5	13	37,5	38	25	25,5
Valor p	0,22		0,22		0,22		0,50	

Teste T pareado  $p \leq 0,05$

**APÊNDICE 8** – Análise estatística da comparação entre os avaliadores da variável exocitose de mastócitos da amostra A.

Animal	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>	
	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2
R1	14	13	9	8	20	21	16	15
R2	10	10	16	16	6	6	13	13
R3	14	15	0	0	18	19	6	7
R4	9	9	10	11	15	15	17	17
R5	27	28	15	15	18	17	9	8
R6	11	11	14	14	20	20	4	5
R7	13	14	16	15	6	7	13	13
R8	11	11	1	1	13	13	11	12
R9	10	9	6	6	17	16	7	7
R10	19	19	2	3	12	12	13	14
R11	9	9	5	5	11	11	17	17
R12	0	1	11	12	12	13	16	15
Média	12,5	12,41	8,75	8,83	14	14,16	11,83	11,91
Mediana	12	12,5	15	14,5	13	13,5	8,5	9
Valor p	0,22		0,44		0,22		0,50	

Teste T pareado  $p \leq 0,05$

**APÊNDICE 9** – Análise estatística da comparação entre os avaliadores da variável exocitose de mastócitos da amostra B.

	<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>	
Animal	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2
R1	7	6	8	7	12	11	5	6
R2	2	2	9	8	3	3	7	6
R3	3	4	1	2	5	6	3	3
R4	2	2	2	2	7	8	4	5
R5	3	2	3	3	6	6	3	3
R6	9	8	3	4	2	1	4	3
R7	2	2	1	1	5	5	11	11
R8	1	2	1	2	5	4	7	8
R9	4	4	4	4	4	4	5	4
R10	2	3	5	4	6	7	4	5
R11	1	1	2	2	10	9	5	5
R12	3	2	5	6	11	10	2	3
Média	3,25	3,16	3,66	3,75	6,33	6,16	5	5,16
Mediana	5,5	5	2	2,5	3,5	3	7,5	7
Valor p	0,50		0,50		0,26		0,26	

Teste T pareado  $p \leq 0,05$

**APÊNDICE 10** – Análise estatística da correlação entre a porcentagem da área de necrose e os valores obtidos com densidade vascular e exocitose de mastócitos em todos os grupos.

<b>Grupo 1 (Simulação)</b>		
<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>Valor p</b>
Necrose x Densidade vascular – Amostra A	0,10	0,76
Necrose x Densidade vascular – Amostra B	0,15	0,63
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,03	0,93
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,05	0,88

Coeficiente de Correlação de Pearson  $p \leq 0,05$

<b>Grupo 2 (Laser 0,14J)</b>		
<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>Valor p</b>
Necrose x Densidade vascular – Amostra A	0,20	0,54
Necrose x Densidade vascular – Amostra B	0,25	0,43
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,06	0,85
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,07	0,82

Coeficiente de Correlação de Pearson  $p \leq 0,05$

**APÊNDICE 10** – Análise estatística da correlação entre a porcentagem da área de necrose e os valores obtidos com densidade vascular e exocitose de mastócitos em todos os grupos.

<b>Grupo 3 (LED 2,49J)</b>		
<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>Valor p</b>
Necrose x Densidade vascular – Amostra A	0,12	0,71
Necrose x Densidade vascular – Amostra B	0,07	0,84
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,26	0,41
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,17	0,60

Coefficiente de Correlação de Pearson  $p \leq 0,05$

<b>Grupo 4 (Laser 2,49J)</b>		
<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>Valor p</b>
Necrose x Densidade vascular – Amostra A	0,07	0,82
Necrose x Densidade vascular – Amostra B	0,36	0,25
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,10	0,75
Necrose x Mastócitos – Amostra A	0,31	0,32

Coefficiente de Correlação de Pearson  $p \leq 0,05$