

PAOLA KARYNNE PINHEIRO MONTEIRO

**TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE PRÉ-
INCISIONAL NA CICATRIZAÇÃO EM PELE DE
RATOS.**

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

SÃO PAULO

2014

PAOLA KARYNNE PINHEIRO MONTEIRO

**TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE PRÉ-
INCISIONAL NA CICATRIZAÇÃO EM PELE DE
RATOS**

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

ORIENTADOR: Prof. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

Prof. BERNARDO SÉRGIO HOCHMAN

(in memoriam)

COORIENTADORES: Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI

Prof. RICHARD ELOIN LIEBANO

SÃO PAULO

2014

Monteiro, Paola Karynne Pinheiro.

Terapia a Laser de Baixa Intensidade pré-incisional na cicatrização em pele de ratos./ Paola Karynne Pinheiro Monteiro.--São Paulo, 2014.

xx, 75f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós - Graduação em Cirurgia Translacional.

Low Level Laser Therapy in pre-incision healing in rat skin.

1. Pele. 2. Terapia laser de baixa intensidade. 3. Período pré-operatório. 4. Cicatrização

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, por sua infinita bondade para comigo e por permitir que o tenha em minha vida. Caminhei até aqui porque me sustentaste e guiaste. E, junto a Deus, **NOSSA SENHORA DE NAZARÉ** e **NOSSA SENHORA DE FÁTIMA**, minhas protetoras, que me regem e me guardam.

Aos meus pais **HEYDER DE CASTRO MONTEIRO E SANDRA REGINA PINHEIRO MONTEIRO**, pais, amigos e companheiros. Agradeço a Deus por sermos uma família tão unida, e como em todos os momentos da minha vida, vocês estão aqui presentes. Nas horas em que os ideais pareciam distantes e inatingíveis, vocês estavam presentes, à disposição para ouvir, orientar, encorajar e fazer-me acreditar que sou vencedora. Meus pais, vocês são meu melhor presente! Sem vocês o mundo não seria tão gracioso.

Aos meus irmãos **HEYDER DE CASTRO MONTEIRO JUNIOR, ANA PAULA PINHEIRO MONTEIRO E ANA GABRIELA PINHEIRO MONTEIRO**, meus grandes amigos, que me incentivam a buscar por novas conquistas e torcem pela minha vitória todos os dias. A todo o momento demonstram gestos de amor. Para sempre estaremos juntos.

Aos meus avós, em especial a **CÂNDIDO DE CASTRO MONTEIRO** e **MARIA JOSÉ DE CASTRO MONTEIRO**, apesar de não estarem mais presentes fisicamente, moram para sempre no meu coração e estão presentes em todos os momentos da minha vida. Sempre carinhosos, incentivaram meus estudos, dando-me a oportunidade de

buscar conhecimento e estar vivendo este momento tão importante na minha vida profissional e pessoal. Peço neste momento, como todos os dias, a benção de vocês.

Aos meus tios, em especial a **HÉLCIO DE CASTRO MONTEIRO**, por despertar a curiosidade de sair de casa, do conforto do meu lar, da minha cidade em Belém do Pará e procurar algo novo, bem longe de todos os meus familiares. A distância, a troca de experiências profissionais e pessoais, me faz crescer a cada dia e ficar cada vez mais forte para enfrentar o mundo.

A todos os meus **FAMILIARES**, que a cada visita a Belém do Pará fazem uma festa, com demonstrações de afeto e dando-me força para seguir em frente.

À amiga **MAÍRA COSTA DA SILVA**, que incentivou os primeiros passos para iniciar um novo caminho, hoje seguido. Agradeço por todo carinho.

À amiga **ARAINY SUÉLY ANTUNES**, nos conhecemos no curso de aperfeiçoamento e construímos uma amizade que perdura até hoje, passamos por momentos de alegrias e dificuldades, mas sempre sorrimos no final. Agradeço a ajuda para a realização desse estudo, pelas conversas, palavras de incentivo. Sem você, este sonho não seria concretizado.

À amiga **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, pela amizade construída e, sobretudo, pelo direcionamento, sugestões e paciência. Você foi muito importante para a realização deste estudo, a convivência com você é um aprendizado diário e me faz crescer a cada dia como profissional.

A KARINA PAULA DE SOUSA AIRES, KARIME ROSE NERY DE SOUZA, LORENA MARIA TÓFOLO CARNEIRO, NATÁLIA SILVA DA SILVA, BRUNO SALGADO CORDEIRO CAMARÃO, JOSÉ VICENTE DA SILVA MARQUES JÚNIOR, SWENY FERNANDES, JAQUELINE MONTORIL SAMPAIO MOTA, MIEDJA BRAGA, VALENTINA PRATA ELIAS, GUSTAVO LUCAS DE ALMEIDA
constantes estimuladores de meus estudos, sempre preocupados e carinhosos em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. **MIGUEL SABINO NETO**, CIRURGIÃO PLÁSTICO, COODENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), LIVRE DOCENTE E PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pela oportunidade de participar deste Programa de Pós Graduação, o qual coordena com tanto empenho e sucesso;

Ao PROF. **BERNARDO SÉRGIO HOCHMAN RZESZETKOWSKI** (*in memoriam*), CIRURGIÃO PLÁSTICO, PROFESSOR AFILIADO AO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela acolhida, conversas, direcionamentos e aprendizado durante os anos convividos. Sua partida foi rápida demais, mas as sementes que o senhor plantou, na vida de cada um que desfrutou da sua convivência, serão eternas. Agradeço imensamente por acreditar neste estudo, por despertar a curiosidade nos pequenos detalhes. O senhor, mesmo na triste ausência, será para sempre um grande pesquisador.

Ao PROF. **SILVIO EDUARDO DUAILIBI**, DENTISTA, PROFESSOR AFILIADO AO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA E

ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela acolhida durante um momento muito difícil, por aceitar fazer parte deste projeto e transmitir o seu conhecimento e experiência.

Ao PROF. **CARLOS EDUARDO PINFILDI**, FISIOTERAPEUTA, PROFESSOR ADJUNTO E ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIFESP – CAMPUS BAIXADA SANTISTA, pela grande amizade construída, por toda a dedicação e companheirismo, por transmitir segurança e tranquilidade necessárias para lidar com as dificuldades do estudo e, principalmente, pelo exemplo profissional, um grande profissional, humilde e à disposição para compartilhar seus ensinamentos. Agradeço imensamente pelas sugestões, críticas e correções feitas;

Ao PROF. **RICHARD ELOIN LIEBANO**, FISIOTERAPEUTA, COORIENTADOR E PROFESSOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, por toda dedicação, pelas correções e sugestões feitas para engrandecer o trabalho, sempre com muito comprometimento e atenção.

À PROFA. **MÔNICA TALARICO DUAILIBI**, DENTISTA, PROFESSORA AFILIADA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela acolhida, sugestões e

críticas realizadas.

À PROFA. FABIANNE MAGALHÃES GIRARDIN PIMENTEL FURTADO, FISIOTERAPEUTA, PROFESSORA DO CURSO DE FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE BARBACENA, COORIENTADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP pela colaboração na orientação deste estudo, sempre atenciosa e sincera.

Aos **DEMAIS DOCENTES** DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelas críticas e sugestões que engrandeceram este estudo;

À ROBERTA DE ARAÚJO COSTA FOLHA, ÉRIKA PATRÍCIA RAMPZO DA SILVA, SILVILENA BONATTI, FISIOTERAPEUTAS, MESTRES PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, o meu profundo agradecimento pelo auxílio nas atividades de laboratório, companheirismo e amizade.

Aos **DEMAIS COLEGAS**, PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelas críticas e sugestões feitas ao longo destes anos;

À CAMILA MARIA BAPTISTA PALAZZI, ALUNA DO CURSO DE APERFEIÇOAMENTO EM PESQUISA CIENTÍFICA EM CIRURGIA, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Às secretárias, **MARTA REJANE DOS REIS, SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS E SANDRA DA SILVA**, sempre dispostas a ajudar, permitindo que tudo ocorresse da melhor forma possível.

Ao **SR. JOILSON MOURA DOS SANTOS**, pela colaboração, sempre prestativo e atencioso.

Ao **SR. ANTÔNIO RODRIGUES DOS SANTOS**, BIOTERISTA DO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIFESP, pelas orientações e cuidados prestados aos animais durante a execução do experimento.

Ao **PAULO CÉSAR SIMÕES SILVA**, HISTOLOGISTA DO LABORATÓRIO DE HISTOTECNOLOGIA DO CENTRO DE TERAPIA CELULAR E MOLECULAR DA UNIFESP (CTCMol/UNIFESP), pela disponibilidade e paciência durante a fase de análise e interpretação de resultados deste estudo.

Ao **RINALDO FLORÊNCIO DA SILVA**, BIÓLOGO, DOUTORANDO DO DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA DA DISCIPLINA DE HISTOLOGIA E BIOLOGIA ESTRUTURAL DA UNIFESP, pela prestatividade, colaboração e orientações durante as avaliações do experimento.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL** DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO por disponibilizar a bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Os meus **Sinceros Agradecimentos** a todos que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.

“Minha doce mãezinha, Senhora Rainha de Nazaré. És a nossa santinha, defesa divina, amiga para o que vier. Sempre nosso refúgio seguro, na angústia e em tudo que for. Em teus braços lançamos nosso desengano, acertos, aperto e temor.” (Oração do Romeiro - Antônio Salame. 2004)

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| DEDICATÓRIA | iv |
| AGRADECIMENTOS | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiv |
| LISTA DE TABELAS | xv |
| LISTA DE QUADROS..... | xvi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xvii |
| RESUMO..... | xx |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2.OBJETIVO | 5 |
| 3.LITERATURA..... | 7 |
| 4.MÉTODOS..... | 15 |
| 5.RESULTADOS..... | 32 |
| 6.DISSCUSSÃO..... | 36 |
| 7.CONCLUSÃO..... | 47 |
| 8.REFERÊNCIAS..... | 49 |
| NORMAS ADOTADAS..... | 57 |
| ABSTRACT..... | 59 |
| APÊNDICES..... | 60 |
| ANEXOS..... | 69 |
| FONTES CONSULTADAS..... | 75 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Fluxograma da distribuição dos grupos e subgrupos | 16 |
| Figura 2a. | Gabarito de acetato (4x10cm) | 18 |
| Figura 2b. | Região dorsal do animal após epilação digital | 18 |
| Figura 3a. | Gabarito de acetato (2x5cm), contendo 3 aberturas de 3 mm, equidistantes de 1 cm | 19 |
| Figura 3b. | Demarcação dos pontos de aplicação dos grupos GS, GLV e GLIV | 19 |
| Figura 4. | Aparelho emissor de radiação <i>laser</i> de baixa intensidade de 603nm e 808nm (AlGaInP)..... | 20 |
| Figura 5a. | Suporte para aplicação da LLLT | 20 |
| Figura 5b. | Aplicação da LLLT no grupo GLV..... | 20 |
| Figura 6a. | Demarcação no dorso do animal, com gabarito de acetato e caneta dermatográfica de incisão com 3cm, e dos pontos de sutura equidistantes de 1cm, entre si, a partir das extremidades..... | 23 |
| Figura 6b. | Incisão de 3 cm no dorso do animal contendo 2 pontos de sutura equidistantes de 1 cm | 23 |
| Figura 7a. | Demonstração do gabarito de acetato (3x5cm) contendo uma abertura em forma de retângulo com as medidas da amostra a ser retirada (1x2cm)..... | 24 |
| Figura 7b. | Gabarito posicionado para delimitar a área de coleta de tecido cicatricial e pele adjacente, compreendido no terço médio da cicatriz..... | 24 |
| Figura 8a. | Amostra fixa com alfinete colorido, mantida em formol tamponado 10%, logo após a retirada | 25 |
| Figura 8b. | Cassete histológico identificado com número do animal e dia de coleta para alojar a amostra coletada | 25 |
| Figura 8c. | Frasco contendo formol tamponado a 10% para armazenamento das amostras..... | 25 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Medidas descritivas da variável de vasos sanguíneos, segundo os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3,7 e 14 dias)..... | 33 |
| Tabela 2. | Medidas descritivas da variável de mastócitos, segundo os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3,7 e 14 dias)..... | 34 |
| Tabela 3. | Resultados da aplicação do modelo de análise de variância para as variáveis-resposta vasos e mastócitos..... | 34 |
| Tabela 4. | Resultados da avaliação do colágeno total em valores percentuais para os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3,7 e 14 dias) | 35 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 1. | Parâmetros utilizados em cada grupo, para irradiação por ponto. E: Energia total; DE: Densidade de Energia; t: tempo; GS: Grupo Simulação; GLV: Grupo Laser Vermelho; GLIV: Grupo Laser Infravermelho | 21 |
|-----------|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|--|
| AlGaInP | Alumínio Gálio Índio Fósforo |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| He-Ne | Hélio-Neônio |
| °C | Graus Celsius |
| CEDEME | Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CGRP | Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| DE | Densidade de Energia |
| DP | Desvio Padrão |
| DP | Densidade de Potência |
| E | Energia total |
| <i>et al</i> | E colaboradores |
| EPM | Escola Paulista de Medicina |
| g | Gramas |
| ° | Graus |
| GS | Grupo Sham |
| GLV | Grupo Laser Vermelho |
| GLIV | Grupo Laser Infravermelho |
| GS3 | Grupo Sham 3 dias |
| GS7 | Grupo Sham 7 dias |
| GS14 | Grupo Sham 14 dias |

| | |
|-------------------|--|
| GLV3 | Grupo Laser Vermelho 3 dias |
| GLV7 | Grupo Laser Vermelho 7 dias |
| GLV14 | Grupo Laser Vermelho 14 dias |
| GLIV3 | Grupo Laser Infravermelho 3 dias |
| GLIV7 | Grupo Laser Infravermelho 7 dias |
| GLIV14 | Grupo Laser Infravermelho 14 dias |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| J/cm ² | Joules por centímetro quadrado |
| J | Joules |
| Kg | Quilograma |
| 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 |
| LLLT | <i>Low Level Laser Therapy</i> – Terapia Laser de Baixa Intensidade |
| MEC | Matriz Extracelular |
| µm | Micrômetro |
| mg | Miligrama |
| mg/kg | Miligrama por quilograma de massa corporal |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mW | Miliwatt |
| n | Número da amostra |
| nm | Nanômetro |
| P | Potência de Saída |
| PVC | Policloreto de Polivinila |
| % | Porcentagem |

| | |
|---------|-----------------------------------|
| RO | Retardo óptico |
| s | Segundo |
| SP | Substância P |
| t | Tempo |
| UNIFESP | Universidade Federal de São Paulo |
| W | Watt |

RESUMO

Introdução: O processo de cicatrização envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos e qualquer desequilíbrio pode acarretar em alterações da cicatriz. **Objetivo:** Avaliar a Terapia Laser de Baixa Intensidade pré-incisional na cicatrização em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 90 ratos, distribuídos em três grupos: Grupo Simulação (GS); Grupo Laser Vermelho (GLV) e Grupo Laser Infravermelho (GLIV). Os grupos foram subdivididos em três subgrupos, correspondentes ao 3º, 7º e 14º dias de avaliação. Foi realizada uma ferida incisional no dorso do animal, contendo 3cm. O GS não recebeu tratamento, GLV e GLIV foi utilizada uma energia de 60J por ponto, totalizando três pontos de aplicação, com tempo 600s. As amostras foram coletas do terço médio da cicatriz e logo após foram coradas por hematoxilina-eosina para identificação de vasos, azul de toluidina para mastócitos e picro sirus para colágeno total. **Resultados:** Não houve diferença significativa com relação à quantidade de vasos e mastócitos entre os grupos e períodos avaliados. Houve diferença significativa na avaliação de picro sirus, onde o grupo GS 14º apresentou uma concentração maior de colágeno total quando comparado a GS3º e GS7º. Já os grupos GLV e GLIV 14º apresentaram uma diminuição do colágeno total quando comparado ao GS14º. **Conclusão:** A Terapia Laser de Baixa Intensidade pré-incisional diminui a quantidade de colágeno total.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que interagem para que ocorra a reparação tecidual (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003; EMING, KRIEG, DAVIDSON, 2007; GURTNER *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009). Qualquer desequilíbrio nessa cascata de eventos pode acarretar em retardo da cicatrização, como a formação de úlceras (KAVROS, MILLER, HANNA, 2007; BRANDI *et al.*, 2010) ou exacerbação dessas, resultando em cicatrizes fibroproliferativas (HOCHMAN *et al.*, 2005; ROBLES & BERG, 2007; KÖSE & WASEEN, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; LEVTOV *et al.*, 2013).

Ao longo de três décadas, os recursos biofísicos, tais como campos eletromagnéticos, ultrassom e Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT, *Low Level Laser Therapy*), são utilizados a fim de modular o processo de cicatrização (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; CORAZZA *et al.*, 2007; BRANDI *et al.*, 2010). A LLLT, nos espectros vermelho (630 a 690nm) e infravermelho (780 a 980nm), apresenta efeitos estimulatórios nas funções celulares (PEPLOW, CHUNG, BAXTER, 2010; ANDRADE, CLARK, FERREIRA, 2014), nomeado por “fotobioestimulação”, é utilizado no tratamento de uma série de condições, incluindo lesões de tecidos moles, feridas graves, dor crônica, entre outros (LUBART *et al.*, 2005). A utilização desse agente biofísico em diferentes comprimentos de onda e doses pode influenciar no efeito estimulatório (baixa energia) ou inibitório (alta energia) (EVANS & ABRAHAMSE, 2008).

Há poucos estudos com foco nos efeitos inibitórios, a investigação desses efeitos, entretanto, seria de grande valia no futuro para o tratamento de cicatrizes fibroproliferativas, que caracterizam-se pela hiperprodução de fibras colágenas e, secundariamente, pela hiperplasia de fibroblastos (WEBB & DYSON, 2003; MOORE *et al.*, 2005; HOCHMAN *et al.*, 2012; HOCHMAN *et al.*, 2014; LEV-TOV *et al.*, 2013).

Recentemente, os pesquisadores voltaram-se à investigação da LLLT, utilizando alta energia, o que levaria a uma possível reorganização parcial ou total do tecido (KARU, PYATIBRAT, KALENDO, 1995). A literatura relata que repetidas exposições a doses mais elevadas ($16\text{J}/\text{cm}^2$) causa tensão adicional que ocasionará uma redução da migração celular, da viabilidade celular, da atividade da adenosina trifosfato (ATP), da inibição da proliferação celular de fibroblastos e da apoptose celular (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; EVANS & ABRAHAMSE, 2008; PELOW, CHUNG, BAXTER, 2012). Além disso, a reduzida disponibilidade de ATP resulta em falhas de geração de potenciais de ação e na interrupção da condução nervosa (CHOW *et al.*, 2011). Entretanto, as mudanças nos níveis de ATP e na estimulação dos fotorreceptores pela LLLT na cadeia respiratória mitocondrial não estão bem estabelecidas, sendo alvo de várias discussões.

Ademais, a maioria dos resultados encontrados é advinda de estudos *in vitro*, que (utilizando a fototerapia de baixa intensidade, em alta energia) relataram a inibição do metabolismo celular, apoptose, inibição da proliferação de fibroblastos, no espectro vermelho e infravermelho, sem alteração na viabilidade celular (SHU *et al.*, 2002; WEBB & DYSON, 2003; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; BONATTI *et al.*, 2011; LEV-TOV *et al.*, 2013-a; LEV-TOV *et al.*, 2013-b). A correlação dos resultados

encontrados em estudos *in vitro* e a alteração no estado homeostático da pele antes de uma lesão poderiam influenciar tanto a intensidade quanto a qualidade da fase de inflamação neurogênica e, por conseguinte, alterar o processo de cicatrização de feridas (HOCHMAN *et al.*, 2014). Desta maneira, BORBA *et al.*(2011) realizaram um estudo *in vivo* para avaliar a ação da estimulação elétrica pré-incisional na cicatrização de feridas em ratos, observando aumento de vasos e de fibroblastos além da diminuição de colágeno tipo III durante o processo de cicatrização.

Portanto, os dados encontrados na literatura em relação ao efeito bioinibitório da LLLT nos modelos *in vitro*, somados à escassez de estudos *in vivo*, surgiram questionamentos no sentido de elucidar o comportamento da LLLT aplicada previamente a uma incisão, bem como sua possível biomodulação do processo de cicatrização.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a Terapia Laser de Baixa Intensidade pré-incisional na cicatrização em pele de ratos

LITERATURA

3. LITERATURA

O presente capítulo está subdividido em três tópicos: LLLT com alta energia em estudos *in vitro*; LLLT com alta energia em estudos *in vivo* e agentes biofísicos na pele íntegra e no pré-incisional.

3.1 LLLT com alta energia em estudos *in vitro*

LEE *et al.* (1994) compararam a sensibilidade de fibroblastos de pele normal e de fibroblastos de quelóide em relação à irradiação. Os fibroblastos foram obtidos a partir de cinco amostras de quelóide e de cinco amostras de pele de indivíduos normais, como controles, com idade variável entre 20 e 37 anos. Conforme o aumento da dose de irradiação, o número de células viáveis em grupos irradiados foi notavelmente diminuído, de forma exponencial, sem nenhuma diferença significativa entre as linhagens de células normais e de quelóides. Os autores concluíram que tanto fibroblastos de pele normal, quanto fibroblastos de quelóide são sensíveis a x-irradiação, e que a expressão do gene da matriz extracelular também é afetada por essa exposição.

SHU *et al.* (2002) verificaram o efeito inibitório do laser de He-Ne (Hélio-Neônio) de 632,8nm em cultura de fibroblastos de cicatrizes hipertróficas. As células foram obtidas de cinco pacientes (três homens e duas mulheres) com idade entre 14 e 38 anos, portadores de cicatrizes hipertróficas com período de 8 a 24 meses. Os autores constataram que aplicações repetidas (3 a 5 vezes) com a densidade de energia (DE) de 180 J/cm² resultaram em diminuição do número total de fibroblastos, em comparação aos respectivos controles.

WEBB & DYSON (2003), investigaram o efeito da LLLT de 880 nm em fibroblastos de cicatrizes hipertróficas e de pele. As amostras foram obtidas a partir de biópsias de cicatrizes hipertróficas e pele adjacente de mulheres chinesas de 20 anos de idade submetidas à cirurgia de correção de cicatriz nas regiões de ombro e pescoço. Foi observado que o número de fibroblastos de cicatrizes hipertróficas que receberam DE 2,4 J/cm² foi significativamente menor no quinto dia, em relação ao controle, e que o número de fibroblastos de pele irradiados com ambas as doses foi menor no quarto e quinto dia. Os autores concluíram que (em função das células de pele também terem sido inibidas) o comprimento de onda estudado não deve ser utilizado para cicatrização de úlceras, mas que poderia vir a ser uma alternativa no tratamento de cicatrizes hipertróficas (de acordo com futuros estudos).

EVANS & ABRAHAMSE (2008) avaliaram se a dose e/ou comprimento de onda influencia nas respostas biológicas de fibroblastos irradiados *in vitro*, uma hora após a irradiação do laser. Os resultados indicaram que a dose de 5 J/cm^2 com 632,8 nm resultam em um efeito estimulante que é mais eficaz do que 830 e 1064 nm. Os resultados sugerem que a dose de 16 J/cm^2 pode ter um efeito inibitório, reduzindo a proliferação celular prematuramente. Os autores concluíram que a dose determina o efeito estimulatório ou inibitório, mas também demonstram claramente que o comprimento de onda pode influenciar na resposta celular.

BONATTI *et al.* (2011) quantificaram os fibroblastos de queiloide após irradiação com LED azul 470nm, *in vitro*. Os fibroblastos de queiloide e pele adjacente foram obtidos a partir de seis pacientes. Os autores concluíram que houve uma redução no número de fibroblastos da pele adjacente irradiados com LED azul 470nm na dose de energia de 18 J em comparação com os irradiados a uma dose de energia 6J. Não houve mudanças nos fibroblastos de queiloide contados em qualquer das doses aplicadas 24 h após a irradiação.

LEV-TOV *et al.* (2013) investigaram o efeito do Diodo Emissor de Luz (LED, *Light Emitting Diode*) vermelho na proliferação de fibroblastos e viabilidade em pele humana. Os autores verificaram que todas as DE inibiram a proliferação dos fibroblastos em relação ao controle. O grupo com DE 640 J/cm^2 apresentou um decréscimo na viabilidade quando comparado ao grupo controle e placa de controle da bancada. O efeito foi

dose-dependente: quanto maior a densidade de energia, maior a inibição da multiplicação celular. Os autores ressaltaram o uso da LLLT, no comprimento de onda vermelho, como uma possível alternativa para tratamento de cicatrizes fibroproliferativas.

LEV-TOV *et al.* (2013) investigaram o efeito do LED infravermelho em fibroblastos de pele humana. Foi verificado que todas as densidades de energia inibiram a proliferação dos fibroblastos em relação ao controle. O efeito foi dose-dependente: quanto maior a densidade de energia, maior a inibição da multiplicação celular. Os autores ressaltaram o uso da LLLT, no comprimento de onda infravermelho, como uma possível alternativa para tratamento de cicatrizes fibroproliferativas.

3.2 LLLT com alta energia em estudos *in vivo*

PEREIRA *et al.* (2010) avaliaram o processo inflamatório agudo, bem como o comportamento do mastócitos e da resposta vascular sob a influência do laser em feridas cutâneas. Os autores observaram que é possível uma amplificação do processo inflamatório agudo durante as primeiras horas após o procedimento cirúrgico em ratos submetidos à terapia laser de 670 nm, com $4\text{J}/\text{cm}^2$.

HOCHMAN *et al.* (2014) investigaram o efeito da LLLT e o LED com Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina (CGRP) e substância P (SP) na secreção na pele de rato saudável. Foi observado a presença de SP no Grupo Laser infravermelho, não houve diferença na secreção CGRP entre os grupos. Os autores concluíram que o LLLT no espectro infravermelho (808 nm), com única aplicação de 40J, aumenta a secreção de neuropeptídeo SP na pele de rato saudável.

BONATTI *et al.* (2013) investigaram a ação da terapia a laser de baixa intensidade (808nm) em alta e baixa dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos. Os autores observaram que o retardo óptico (RO) foi maior nos grupos de baixa (GB) e grupo de alta (GA), independentemente do dia de coleta em relação ao grupo simulação (GS). A quantidade de fibroblastos, vasos e tecido de granulação foi reduzida nos grupos com amostra coletada no 14º dia em relação aos grupos com amostra coletada no 7º dia. A quantidade de colágeno tipo I reduziu em todos os grupos, independente do dia de coleta. A quantidade de colágeno tipo III reduziu no 14º dia no GA. Os autores concluíram, portanto, que a LLLT, nas doses de 1,5 e 60J, reduziu fibroblastos, vasos e tecido de granulação no 14º dia, aumentou o RO da cicatriz e pele adjacente, bem como reduziu a quantidade de colágenos tipos I e III no 14º dia com a dose de 60 J.

3.3 Agentes biofísicos na pele íntegra e no pré-incisional

VISNARDI *et al.* (2007) avaliaram a eficácia do ultrassom de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos. As amostras de pele foram obtidas a partir de 15 ratos, que foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (com 5 animais, cada): Grupo Ultrassom, Grupo Placebo e Grupo Controle. Foram realizadas 10 aplicações consecutivas, com intervalo de 2 dias após a quinta aplicação, na pele do dorso dos animais durante 10 minutos. Os autores concluíram que o ultrassom de baixa intensidade, nas condições estudadas, altera a organização das fibras de colágeno na derme, de maneira mais acentuada na camada reticular, promovendo uma desorganização dessas fibras.

DE BEM *et al.* (2010) avaliaram as possíveis alterações histológicas e morfométricas do tecido sadio *in vivo* de ratos Wistar irradiados com diferentes intensidades de ultrassom. Os autores concluíram que o ultrassom em doses maiores promove alterações na epiderme e derme (respectivamente), o aumento da espessura, além da proliferação com adelgaçamento das fibras colágenas, o que alerta para possíveis implicações do uso do ultrassom em estética.

BORBA *et al.* (2011) avaliaram a estimulação elétrica no pré-operatório, na cicatrização em pele de ratos. Os autores concluíram que a estimulação elétrica com polaridade positiva no pré-operatório altera positivamente a angiogênese e a proliferação de fibroblastos. Estes efeitos levam a uma gama de possibilidades, a serem exploradas, para a modulação da cicatrização de feridas (inicialmente no procedimento cirúrgico e, futuramente, poderá evitar cicatrizes atróficas e deiscência de sutura).

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Desenho de Pesquisa

Trata-se de um estudo primário, experimental, intervencional, aleatorizado e controlado. Os experimentos tiveram início após liberação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob o n° 0070/12 (Anexo 1).

4.2 Amostra

Foram utilizados 90 ratos (*Rattus norvegicus: albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), machos, adultos, com oito semanas de idade, massa corpórea de 250g a 320g, da linhagem Wistar EPM-1, oriundos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais de polipropileno, em ambiente higienizado, recebendo água *ad libitum* e ração própria, com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura constante de 22° C.

4.3 Delineamento experimental

A massa corpórea dos 90 animais foi aferida previamente ao início do estudo. A randomização foi realizada por meio do site www.randomization.com, sendo que todos os animais foram submetidos ao procedimento correspondente a cada grupo experimental (Apêndice 1). Os animais foram distribuídos em três grupos, com 30 ratos, cada: Grupo simulação (GS) no qual foi realizada a simulação da aplicação do laser, com o aparelho desligado e posteriormente foi realizada uma incisão no dorso do rato; Grupo Laser Vermelho (GLV) o qual foi realizada a aplicação do laser vermelho e posteriormente uma incisão no dorso do rato; Grupo Laser Infravermelho (GLIV) no qual foi realizada a aplicação do laser infravermelho e, posteriormente, uma incisão no dorso do rato; cada grupo supracitado foi subdividido em três subgrupos contendo 10 ratos, cada, que foram avaliados em três tempos (3°, 7° e 14° dias, respectivamente) (Figura 1).

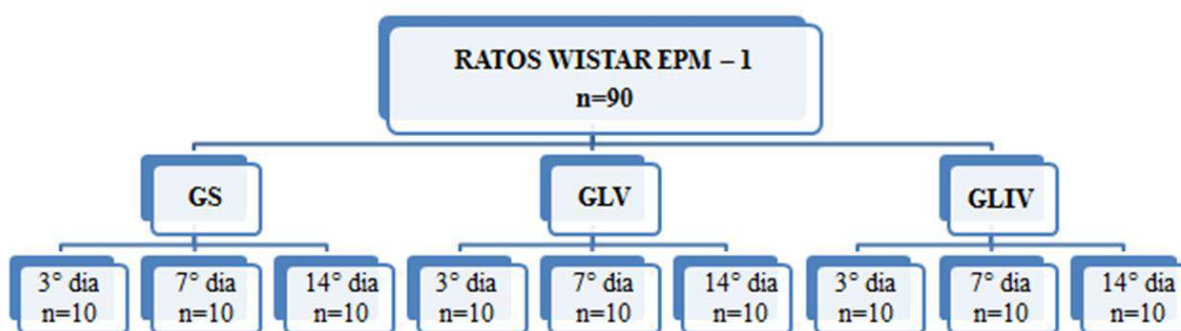


Figura 1 - Fluxograma da distribuição dos grupos e subgrupos.

Grupo simulação (GS): simulação da irradiação laser com o equipamento desligado, durante cinco dias consecutivos, previamente à incisão cutânea no dorso do rato;

Grupo Laser Vermelho (GLV): irradiação laser de comprimento de onda de 603nm de Alumínio Gálio Índio Fósforo (Al-Ga-Inp), com 100mW de potência e energia total de 60J, durante cinco dias consecutivos, previamente à incisão cutânea;

Grupo Laser Infravermelho (GLIV): irradiação laser de comprimento de onda de 808nm de Alumínio Gálio Índio Fósforo (Al-Ga-Inp), com 100mW de potência e energia total 60J, durante cinco dias consecutivos, previamente à incisão cutânea;

4.4 Procedimento de anestesia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal, utilizando Cloridrato de Quetamina (100mg/kg), da marca DOPALEN Injetável (10ml) associado a Cloridrato de Xilazina (50mg/kg), da marca ANASEDAN Injetável (10ml), previamente estabelecida, em doses correspondentes à massa corporal de cada animal. Para a aplicação destes, foram utilizadas uma seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 4,5x13mm, da marca Injex Indústrias Cirúrgicas (Ourinhos – SP/Brasil).

4.5 Procedimento pré-operatório dos animais

No plano anestésico, os animais foram posicionados em prancha cirúrgica, logo após, foi demarcado um retângulo com auxílio de gabarito de acetato (4 x 6cm) (Figura 2a) e caneta dermatográfica a partir da linha

transversa interescapular superior, em sentido crânio-caudal (L1). Além disso, foi demarcada, durante os cinco dias consecutivos do experimento, uma linha longitudinal na região inferior da coluna do animal (L2). Em seguida, foi realizada a epilação digital (Figura 2b).

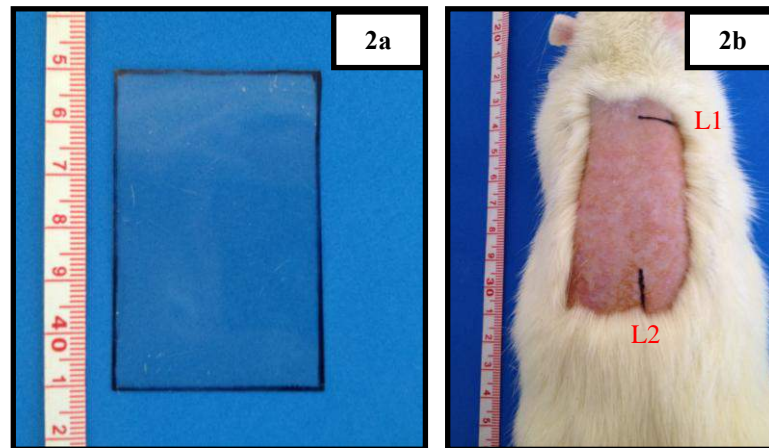


Figura 2a – Gabarito de acetato (4x10cm)

Figura 2b – Região dorsal do animal após epilação digital.

Representação da L1 e L2 demarcadas no experimento.

Após a epilação do dorso do animal, foi utilizado outro gabarito de acetato (2 x 5cm), contendo três aberturas de 3mm, equidistantes de 1cm (Figura 3a). O gabarito foi posicionado no dorso do animal de modo que coincidissem com os pontos de irradiação: um ponto a cada 1cm, a partir de 0,5cm das extremidades, de modo que cada um ficasse no ponto médio entre os pontos de sutura (Figura 3b).

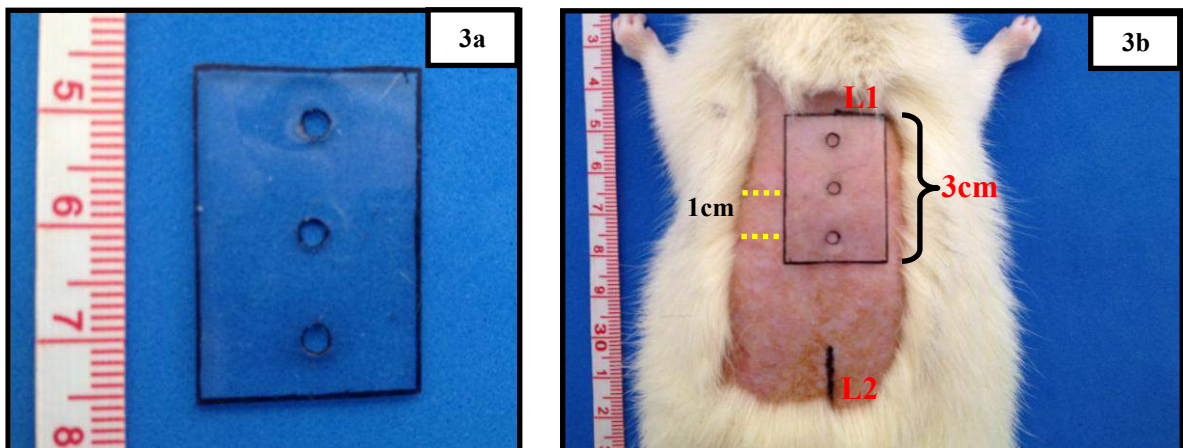


Figura 3a – Gabarito de acetato (2x5cm), contendo três aberturas de 3 mm, equidistantes de 1cm.

Figura 3b – Demarcação dos pontos de aplicação dos grupos GS, GLV e GLIV.

4.6 Equipamento

Foi utilizado o aparelho emissor *laser Thera Lase®* da DMC Equipamentos Ltda. (São Carlos – SP/ Brasil), com comprimento de onda de 603nm e 808nm de Al-Ga-Inp, com potência de 100 mW, com área de secção transversal do feixe de $0,028\text{cm}^2$, feixe contínuo e fibra óptica (Figura 4). O aparelho foi aferido antes da fase experimental e, ao término da mesma, em instituição credenciada (Anexo 2).



Figura 4 – Aparelho emissor de irradiação laser de baixa intensidade de 603nm e 808nm (AlGaInp).

4.7 Aplicação da LLLT

Após o posicionamento do animal e do gabarito, a caneta do laser foi colocada no suporte, de modo que permanecesse imóvel durante o procedimento (Figura 5a). A ponta da caneta do laser foi envolvida por filme plástico de policloreto de polivinila (PVC), trocado após a irradiação em cada animal (Figura 5b).



Figura 5a – Suporte para aplicação da LLLT.

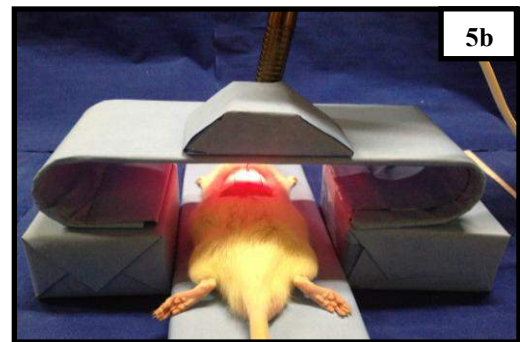


Figura 5b – Aplicação da LLLT no grupo GLV.

A aplicação da LLLT foi realizada de modo pontual, com contato e perpendicular à incisão, utilizando uma DE: $2143\text{J}/\text{cm}^2$, t: 600s, E/por ponto: 60J e E/total: 180J, para os grupos GLV e GLIV. No grupo GS, foi utilizado t:600s com o equipamento desligado (Quadro 1).

| PARAMÊTROS | GS | GLV | GLIV |
|-------------------------------|-----|------|------|
| Energia/ponto (J) | 0 | 60 | 60 |
| DE (J/cm^2) | 0 | 2143 | 2143 |
| t (s) | 600 | 600 | 600 |
| E (J) | 0 | 180 | 180 |

Quadro1 - Parâmetros utilizados em cada grupo, para irradiação por ponto.

E: Energia total; DE: Densidade de Energia; t: tempo; GS: Grupo Simulação; GLV: Grupo Laser Vermelho; GLIV: Grupo Laser Infravermelho.

Em todos os grupos, a aplicação do laser foi realizada no centro dos três pontos, que foram padronizados previamente com gabarito de acetato, sendo demarcados a cada 1cm, a partir de 0,5cm da extremidade cranial até 0,5cm da extremidade caudal, de maneira que o local de irradiação fosse o ponto médio entre cada ponto de sutura, conforme descrito.

Como o equipamento possui densidade de energia máxima de $999\text{J}/\text{cm}^2$, foi realizado cálculo com o intuito de que o tecido recebesse

adequadamente a dose de energia: foram acionados três disparos em cada ponto com DE de $714\text{J}/\text{cm}^2$, que equivalem ao tempo de 10 minutos e energia de 20 J. Para que o pesquisador acompanhasse a irradiação, foi utilizado um papel para anotação, relacionando cada ponto e o número de disparos realizados.

As aplicações, de acordo com os respectivos grupos, foram realizadas após um minuto da demarcação adotada, durante cinco dias consecutivos prévios à incisão cutânea. Foram realizadas a cada 24 horas, sempre no período matutino, pelo mesmo pesquisador.

4.8 Procedimento de Incisão cutânea

Após 24 horas do último dia de tratamento, no 6^o dia, a partir de outro gabarito de acetato (2 x 3cm), foi demarcada a linha de incisão e dos pontos de sutura, com caneta dermográfica (Figura 6a). Na incisão, com comprimento de 3cm, foram delimitados pontos equidistantes de 1cm a partir das extremidades, e entre si, para a realização da sutura. Com auxílio de um bisturi, com lâmina nº11 estéril, foi realizada a incisão no sentido crânio-caudal, na linha mediana dorsal, sobre a linha traçada acima descrita, incluindo pele e panículo carnosos até a fáscia muscular (Figura 6b). A hemostasia foi realizada com suave manobra de compressão com gaze estéril seca. Em seguida, a incisão foi suturada por ponto simples com fio monofilamentar de náilon 4-0, de forma previamente padronizada (Borba *et al.*, 2011; Bonatti *et al.*, 2013). Ao final do procedimento, foi

realizada em todos os ratos analgesia com cloridrato de tramadol (5mg/kg). Não houve qualquer tipo de curativo para este procedimento.

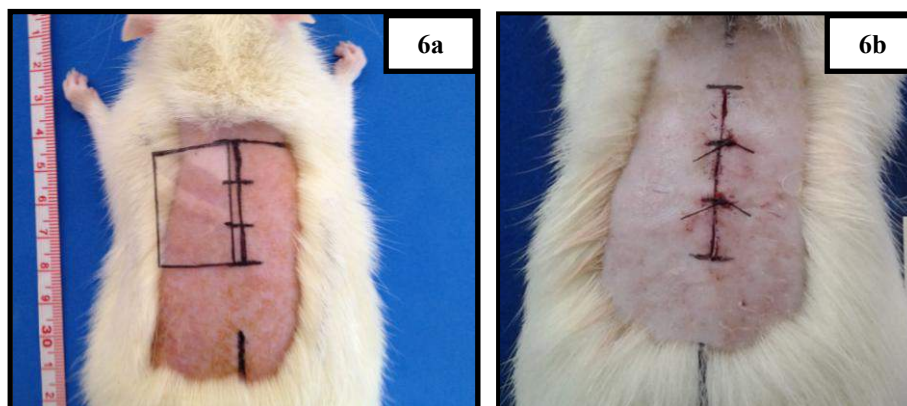


Figura 6a: Demarcação no dorso do animal, com gabarito de acetato e caneta dermográfica de incisão com 3cm, e dos pontos de sutura equidistantes de 1cm, entre si, a partir das extremidades.

Figura 6b: Incisão de 3cm no dorso do animal contendo dois pontos equidistantes de 1cm.

4.9 Coleta de tecido para análise

As amostras foram coletadas no 3^o, 7^o e 14^o dia, de acordo com os respectivos grupos. No dorso dos animais, com auxílio de gabarito de acetato (3x5cm), no qual foi feita uma abertura em forma de retângulo com as medidas da amostra a ser retirada (1 x 2cm) e feita uma marcação no ponto médio do lado maior do retângulo de modo a coincidir com a cicatriz (Figura 7a). O gabarito foi posicionado no dorso do animal e, com caneta dermográfica, foi demarcada a área de coleta de tecido (Figura 7b), que correspondeu ao terço médio da cicatriz abrangendo 1cm de tecido cicatricial e 2cm de pele adjacente (1cm de cada lado). Com auxílio de

bisturi, a área tecidual correspondente ao terço médio da cicatriz e pele adjacente foi retirada (incluindo tecido cicatricial e dérmico em toda sua profundidade).

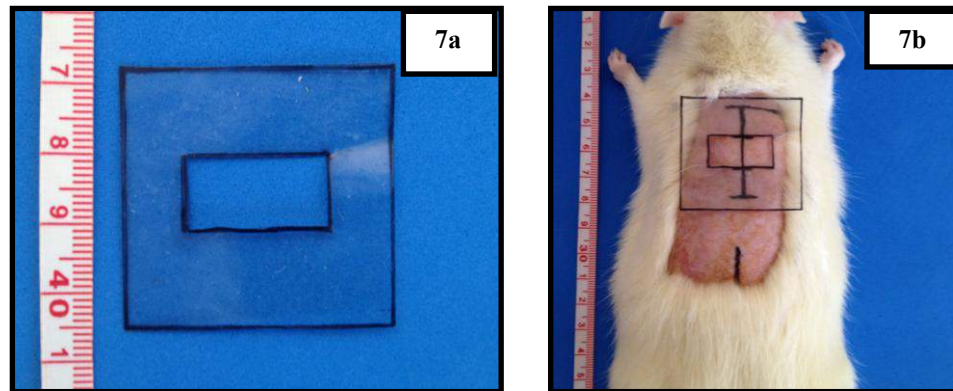


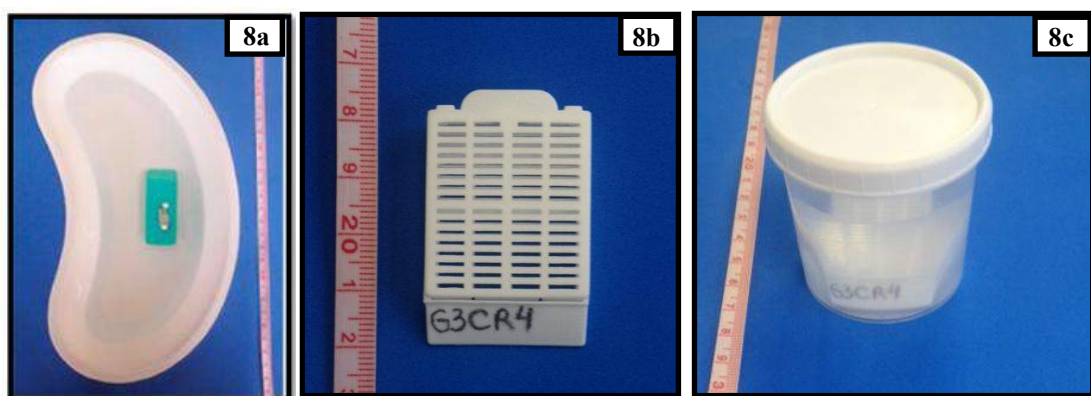
Figura 7a: Demonstração do gabarito de acetato (3x5cm), contendo uma abertura em forma de retângulo com as medidas da amostra a ser retirada (1x2cm).

Figura 7b: Gabarito posicionado para delimitar a área de coleta de tecido cicatricial e pele adjacente, compreendidos no terço médio da cicatriz.

Após obtenção dos tecidos, os animais foram submetidos à morte induzida com hiperdosagem da mistura anestésica via intraperitoneal com cloridrato de quetamina (1g/Kg) e cloridrato de xilazina (500mg/Kg), seguida de secção dos grandes vasos cervicais.

4.10 Preparo das amostras de tecido para análise histológica

As amostras das cicatrizes cutâneas foram fixadas por meio de alfinetes coloridos, em que cada cor correspondia ao número do respectivo animal (Figura 8a). As amostras permaneceram imersas em formol tamponado a 10% por 40 minutos. Em seguida, os tecidos foram retirados da borracha e alocados separadamente em grades k-7 identificadas (Figura 8b), que permaneceram armazenadas em frascos de coleta individuais com solução de formaldeído a 10% (Figura 8c).



8a. Amostra fixada com alfinete colorido e mantida em formol tamponado 10%, logo após a retirada.

8b. Cassete histológico identificado com número do animal e dia de coleta para alojar a amostra coletada.

8c. Frasco contendo formol tamponado a 10% para armazenamento das amostras.

As amostras coletadas foram enviadas ao laboratório da disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Morfologia da UNIFESP para confecção das lâminas histológicas. O material coletado foi processado histologicamente conforme protocolo do Laboratório de Patologia da UNIFESP e embocado em parafina. De cada bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos, montados em lâminas histológicas, previamente silanizadas (Organosilano, Sigma). Os cortes histológicos com 5µm de

espessura foram corados pela técnica histoquímica de hematoxilina e eosina (HE), azul de toluidina e picro sirus.

4.10.1 Histoquímica

4.10.1.1 Técnica de coloração por hematoxilina-eosina para análise de vasos sanguíneos

As lâminas com cortes de 5µm encaminhadas para coloração histoquímica foram previamente desparafinizadas com xilol em três banhos, de cinco minutos, e hidratadas com concentrações decrescentes de álcool etílico, a 100%, 95%, 80%, 70%, e água. Para a coloração, as lâminas permaneceram 20 minutos imersas em Hematoxilina de Harry's, em seguida foram lavadas em água corrente por uma vez. Após isto, foram lavadas cinco segundos com diferenciador para hematoxilina, novamente em água corrente, por duas vezes em solução amoniacal por um minuto e em água corrente uma vez.

Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em Eosina Y 1% em álcool etílico a 95% por cinco a sete minutos. Foi realizada bateria de montagem: duas vezes em álcool etílico a 95%, três vezes em álcool etílico a 100% e três vezes em xilol. A montagem foi efetuada em meio permanente (Ervmount- Erviegas).

4.10.1.2 Técnica de coloração azul de toluidina para análise de mastócitos

Após a retirada das amostras, essas foram colocadas em formol tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico a 70% e 90% por uma hora em cada solução. Em seguida passaram por seis banhos, de uma hora cada, na solução de álcool etílico a 100%. Após os banhos em álcool etílico a 100%, as amostras de pele foram diafanizadas em solução de álcool etílico/xilol 1:1 por uma hora, em seguida passaram por dois banhos de xilol puro; onde a duração do banho foi de uma hora, cada.

As amostras de pele foram retiradas do xilol e colocadas imediatamente em parafina líquida (60°C). Após o banho de parafina as amostras foram levadas a uma estufa a vácuo onde permaneceram por um período de duas horas. Posteriormente os blocos histológicos foram confeccionados.

As amostras de pele inclusas nos blocos de parafina foram cortadas longitudinalmente em cortes semi-seriados com 5µm por meio de um micrótomo rotativo. Os cortes foram montados em lâminas histológicas com lamínulas sobre o tecido. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas novamente para serem confeccionadas para coloração de Azul de Toluidina para identificação dos mastócitos.

4.10.1.3. Técnica para coloração em picro sirius

As amostras foram colocadas em formol tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico a 70% e 90% por uma hora em cada solução. Em seguida passaram por seis banhos, de uma hora cada, na solução de álcool etílico a 100%. Após os banhos em álcool etílico a 100%, as amostras de pele foram diafanizadas em solução de álcool etílico/xilol 1:1 por uma hora, em seguida passaram por dois banhos de xilol puro, com duração de uma hora, cada. As amostras de pele foram retiradas do xilol e colocadas imediatamente em parafina líquida (60°C). Após o banho de parafina as amostras foram levadas a uma estufa a vácuo onde permaneceram por um período de duas horas. Posteriormente, os blocos foram confeccionados para obtenção das lâminas histológicas.

As amostras de pele inclusas nos blocos de parafina foram cortadas longitudinalmente em cortes semi-seriados com 5µm por meio de um micrótomo rotativo. O método de picro sirius baseia-se na característica do corante Sirius Red ser altamente ácido devido aos seis grupamentos sulfônicos que contém e ao fato de reagirem com os grupamentos amínicos das moléculas de lisina presentes no colágeno. De tal modo, que as moléculas do corante se dispõem paralelamente às moléculas de colágeno, orientadas, normalmente, em uma única direção.

4.11 Análise morfométrica

4.11.1 Hematoxilina-eosina e Azul de Toluidina

Os cortes corados pela técnica de hematoxilina-eosina para análise de vasos sanguíneos e azul de toluidina para mastócitos. As lâminas foram classificadas por código, de modo a não se identificar os grupos do presente estudo (Apêndice 2). A obtenção das imagens foi realizada pela câmera (AxioCamMRC) acoplada ao microscópio AX10 da marca ZEISS. Foram obtidas quatro fotomicrografias da área da cicatriz, para cada lâmina, em aumento de 10 vezes (objetiva de 40x), com auxílio do Programa AxioVision Release 4.8.2 SP1 (Apêndice 3 e Apêndice 4).

Realizando a avaliação quantitativa para vasos sanguíneos e mastócitos, o avaliador não tinha conhecimento sobre qual grupo pertencia cada lâmina. Os dados foram anotados em tabelas elaboradas para cada grupo e realizada a soma dos quatro valores encontrados na análise de cada lâmina (Apêndice 5).

4.11.2 Picro sirius

Os cortes corados em picro sirius foram analisados no microscópio AxioLab, da marca Zeiss, com câmera AxioCam MRC e classificados por código, de maneira a não se identificar os grupos. Foi obtida uma fotomicrografia da área da cicatriz em aumento de 10 vezes (objetiva de 10x) para cada lâmina, logo após as imagens foram analisadas no programa ImageJ. A imagem resultante pode ser dividida em cinco ou seis tonalidades diferentes de pixels, a partir da segmentação por *clusters* de

cor. A análise do histograma da nova imagem permite avaliar a frequência e a intensidade de cada grupo de cor (varia de 0 a 255), fornecendo a densidade de colágeno e a estimativa da sua intensidade de tom relativo à cor do fundo (Apêndice 6). Os dados foram anotados em tabelas elaboradas para cada grupo (Apêndice 7).

4.12 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva da análise quantitativa de vasos e mastócitos, dispostas em tabelas de frequência, segundo os grupos e períodos. Logo após, foi realizada uma análise inferencial, utilizando o modelo de análise de variância com dois fatores fixos para avaliar a diferença entre as medidas feitas nos grupos e períodos estudados.

Os dados obtidos das análises quantitativas de colágeno total foram expressos em Média \pm Desvio Padrão (DP). Os grupos foram comparados por meio do teste para análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey* para observar se ocorreram diferenças entre os grupos. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi de $p \leq 0,05$. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, California USA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A estatística descritiva para vasos e mastócitos está apresentada na Tabela 1 e Tabela 2.

TABELA 1 – Medidas descritivas da variável vasos sanguíneos, segundo os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3, 7 e 14 dias).

| Tempo | Grupo | Média | Desvio-padrão | Mínimo | Máximo |
|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------|---------------|
| 3 | GS | 17,40 | 10,55 | 6,00 | 34,00 |
| | GLV | 10,20 | 7,45 | 2,00 | 23,00 |
| | GLIV | 10,89 | 7,49 | 3,00 | 28,00 |
| 7 | GS | 14,11 | 10,46 | 3,00 | 39,00 |
| | GLV | 21,50 | 19,48 | 4,00 | 62,00 |
| | GLIV | 14,70 | 9,23 | 3,00 | 32,00 |
| 14 | GS | 16,60 | 9,92 | 6,00 | 32,00 |
| | GLV | 17,10 | 15,74 | 2,00 | 51,00 |
| | GLIV | 13,22 | 10,33 | 1,00 | 26,00 |

TABELA 2 – Medidas descritivas da variável mastócitos, segundo os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3, 7 e 14 dias).

| Tempo | Grupo | Média | Desvio-padrão | Mínimo | Máximo |
|--------------|--------------|--------------|----------------------|---------------|---------------|
| 3 | GS | 16,50 | 10,98 | 3,00 | 44,00 |
| | GLV | 8,40 | 5,15 | 0,00 | 18,00 |
| | GLIV | 7,56 | 4,33 | 2,00 | 14,00 |
| 7 | GS | 5,00 | 2,35 | 1,00 | 8,00 |
| | GLV | 6,10 | 7,50 | 0,00 | 26,00 |
| | GLIV | 4,90 | 3,75 | 0,00 | 13,00 |
| 14 | GS | 12,30 | 7,45 | 3,00 | 25,00 |
| | GLV | 7,30 | 5,44 | 2,00 | 20,00 |
| | GLIV | 12,33 | 13,44 | 0,00 | 45,00 |

Para avaliar a diferença entre as medidas realizadas nos grupos e períodos, com relação às variáveis vasos e mastócitos, empregou-se o modelo de análise de variância com dois fatores fixos. As observações dos resultados, apresentados na tabela a seguir, permitem afirmar que não houve diferença com relação aos grupos e períodos para as variáveis estudadas (TABELA 3).

TABELA 3 – Resultados da aplicação do modelo de análise de variância para as variáveis-resposta vasos sanguíneos e mastócitos.

| Variáveis | Grupo | Tempo | Interação (Grupo, Tempo) |
|-------------------|--------------|--------------|---------------------------------|
| Vasos | 0,330 | 0,972 | 0,740 |
| Mastócitos | 0,107 | 0,771 | 0,253 |

Na tabela 4 está apresentada a análise descritiva para avaliação dos grupos GS, GLV e GLIV, segundo a birrefringência do colágeno total em valores percentuais nos períodos de 3, 7 e 14 dias.

TABELA 4 – Resultados da avaliação do colágeno total em valores percentuais para os grupos (GS, GLV e GLIV) e períodos (3,7 e 14 dias).

| | GS (%) | | | GLV (%) | | | GLIV (%) | | |
|-----------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias |
| | 11,62 | 7,61 | 19,32 | 5,75 | 5,38 | 3,34 | 3,8 | 4,18 | 2,17 |
| | 9,97 | 7,96 | 8,83 | 9,3 | 7,85 | 9,83 | 2,49 | 3,13 | 6,7 |
| | 10,27 | 12,94 | 21,74 | 7,46 | 3,76 | 9,5 | 1,08 | 8,89 | 4,95 |
| | 14,46 | 7,92 | 14,97 | 4,43 | 4,52 | 7,72 | 5,95 | 6,97 | 4,06 |
| | 5,73 | 2,82 | 9,26 | 4,09 | 9,25 | 5,75 | 5,09 | 2,11 | 4,02 |
| X | 10,41 | 7,85 | 14,82 | 6,20 | 6,15 | 7,22 | 3,68 | 5,05 | 4,38 |
| DP | 2,82 | 3,20 | 5,19 | 1,94 | 2,07 | 2,42 | 1,75 | 2,51 | 1,47 |

Quando comparados os períodos de avaliação (3, 7 e 14 dias) dentro de cada subgrupo estudado, somente houve diferença significativa no GS, sendo observado um aumento do colágeno total no GS 14°, quando comparado com o subgrupo GS 3° e GS 7°.

Já na comparação entre os grupos houve uma diminuição significativa do GLV 14° e GLIV 14° em relação ao GS 14°, porém não houve diferença significativa entre o GLV 14° e GLIV 14°, conforme demonstrado na tabela 4.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Os comprimentos de onda que abrangem o espectro vermelho e infravermelho são os mais pesquisados (GAL *et al.*, 2006; SILVA *et al.* 2006; AL-WATBAN *et al.* 2007; AKYOL & GÜNGÖRMÜS, 2010). No que concerne ao espectro vermelho e infravermelho, estudos *in vitro* têm demonstrado que doses mais elevadas e aplicadas repetidas e seguidas vezes possuem efeito inibitório na proliferação celular, sobretudo de fibroblastos (LEV-TOV *et al.*, 2013-a; LEV-TOV *et al.*, 2013-b HOURELD & ABRAHAMSE, 2008). Esses achados motivaram a realização do presente estudo a fim de investigar se tal comportamento inibitório seria observado no modelo *in vivo*, com aplicação da LLLT previamente a uma incisão cutânea, uma vez que não foram encontrados estudos nesse sentido nas buscas realizadas.

O rato é muito utilizado como modelo animal em estudos que envolvem cicatrização de pele e de retalhos (LIEBANO *et al.*, 2008; PINFILDI *et al.*, 2009; BORBA *et al.*, 2010; WOOD *et al.*, 2010; NISHIOKA *et al.*, 2012; BONATTI *et al.*, 2013), uma vantagem para fins comparativos. Além disso, trata-se de animal de pequeno porte e de simples manuseio quando comparado a outros modelos com animais de porte maior.

Assim, o presente estudo utilizou o modelo experimental de cicatrização de pele em ferida incisional em ratos, o que auxilia o esclarecimento de mecanismos fisiológicos, para perspectivas de estudos clínicos. Além disso, o uso desse animal para estudos como este, possibilita comparações com resultados obtidos na literatura, facilitando o

desenvolvimento da investigação (PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009).

O modelo experimental ideal para o estudo da cicatrização de pele é o porcino, sobretudo com relação a cicatrizes fibroproliferativas (ZHU *et al.*, 2007; RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA, 2008) pela semelhança do seu tecido cutâneo com o humano. Entretanto, é um animal que exige maior disponibilidade de espaço e recursos. A pesquisa experimental prévia com ratos pode abrir perspectivas para realização de estudos com porcos com delineamento mais específico, permitindo avaliar parâmetros histológicos do processo de cicatrização que não poderiam ser avaliados da mesma forma no humano.

Para a realização da ferida incisional foram adotados alguns parâmetros, como escolha da região, tipo de depilação, modelo de ferida e uso de gabaritos. A escolha da região dorsal do rato para realização do estudo foi baseada em estudos prévios como o de PINFILDI *et al.* (2005), REZENDE *et al.* (2007), BORBA *et al.* (2010), BONATTI *et al.* (2013), por se tratar de uma região de fácil acesso para os pesquisadores, além de evitar que o animal a alcance ou faça autofagia na região da ferida. A depilação digital foi o método adotado para remoção dos pelos da região dorsal dos ratos com base em diversos estudos, como os de, PINFILDI *et al.* (2005), LIEBANO *et al.* (2008), BORBA *et al.* (2010), NISHIOKA *et al.* (2012), BONATTI *et al.* (2013), entre outros.

No que se refere ao modelo de ferida, o excisional é o mais utilizado para análise de infiltrado inflamatório pela técnica de coloração Hematoxilina e Eosina, além da contração da ferida (CORAZZA *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2008; ADAMSKAYA *et al.*, 2010; HEGDE *et*

al., 2011). Entretanto, no presente estudo, foi estudada a ferida incisional, que é utilizada na prática clínica durante procedimentos cirúrgicos (YAZUKAWA *et al.*, 2007; AKYOL *et al.*, 2010; BORBA *et al.*, 2010; BONATTI *et al.*, 2013), sobretudo na área de Cirurgia Plástica, o que motivou a escolha desse modelo de ferida.

Com relação ao uso de gabaritos de acetato em diversas etapas da fase experimental, eles permitem realizar os procedimentos de modo uniforme e reprodutível, minimizando o risco de erros de posicionamentos e medidas (PINLFILDI *et al.*, 2005; PINLFILDI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010; NISHIOKA *et al.*, 2012; BONATTI *et al.*, 2013).

Outro aspecto importante a ser observado no delineamento da pesquisa é o fato de que a literatura apresenta diversos estudos autocontrolados com fototerapia em cicatrização em pele de ratos, com duas ou mais feridas no mesmo animal, sendo uma(s) irradiada(s) e outra(s) não (SILVA *et al.*, 2006; YASUKAWA, 2007; GÜNGÖRMÜS & AKYOL, 2009; AKYOL & GÜNGÖRMÜS, 2010). Isso vai de encontro ao possível efeito sistêmico da LLLT relatado por RODRIGO *et al.* (2009). Para evitar esse viés, neste estudo foi utilizada apenas uma ferida por animal e o grupo simulação, no qual foi provocada a mesma ferida incisional dos grupos experimentais (descrita no delineamento), mas tendo sido exposto à simulação da LLLT, com a caneta desligada.

Seguindo a padronização dos procedimentos realizados, para aplicação de laser nos animais, foi utilizada a técnica pontual com contato e perpendicular à região irradiada, conforme observado nos estudos mais recentes com LLLT (PINLFILDI *et al.*, 2008; WOOD *et al.*, 2010; SILVEIRA *et al.*, 2011; PECCIN *et al.*, 2012; BONATTI *et al.*, 2013). Para assegurar que a caneta permanecesse nessas condições, durante todo o período de

irradiação, foi utilizado um suporte para apoio da caneta do laser. Importante notar que, na prática clínica, o fisioterapeuta segura a caneta, o que pode implicar em variação de posição do feixe de luz por conta da fadiga muscular que pode ocorrer quando o tempo de terapia é longo (como no caso do presente estudo).

Os comprimentos de onda acima de 500nm são amplamente utilizados para estimular a cicatrização, sobretudo nas faixas do vermelho e do infravermelho (SILVA *et al.*, 2009). Sabe-se que o mecanismo de ação da fototerapia depende do comprimento de onda utilizado e da energia total ofertada (FAROUK *et al.*, 2007; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2013), que influenciam diretamente no metabolismo mitocondrial, agindo em cromóforos da membrana e da cadeia respiratória (KARU, 2005; BONATTI *et al.*, 2011) e modulando diversos mecanismos biológicos como proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais), síntese de colágeno e matriz extracelular (REZENDE *et al.*, 2008; GÜRGÖRMUS *et al.*, 2009; HEGDE *et al.*, 2011; AKYOL *et al.*, 2010).

Nesse sentido, há relatos na literatura, de estudos *in vitro*, de que o comprimento de onda vermelho e infravermelho, além do efeito estimulatório no processo cicatricial, pode ainda exercer efeito inibitório (WEBB & DYSON, 2003; LEV-TOV *et al.*, 2013-a; LEV-TOV *et al.*, 2013-b). Já para estudo *in vivo*, observou-se que uma energia alta de 60J, no comprimento de onda infravermelho, aplicada por cinco dias consecutivos em ferida incisional em ratos, foi eficiente no aumento do retardo óptico das fibras de colágeno da cicatriz e pele adjacente e reduziu colágeno do tipo I no 7^o e 14^o dia de avaliação (BONATTI *et al.*, 2013). Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos *in vivo* que descrevessem a aplicação da LLLT no período pré-operatório de ferida incisional, utilizando alta energia. O que poderia ter relevância clínica no tratamento e

prevenção de cicatrizes fibroproliferativas, caracterizadas pelo aumento da quantidade e expressão dos fibroblastos (HOCHMAN *et al.*, 2005). Este fato motivou a escolha do comprimento de onda vermelho e infravermelho.

Além do comprimento de onda, a quantidade de energia também é um fator preponderante na resposta celular. Um dos fatores que contribui para convergência e entendimento da quantidade de energia empregada no tecido é o parâmetro energia total (E), atualmente discutido e analisado em estudos com LLLT. Quando se discute energia total ou energia, considera-se que $E=P$ (potência de saída em mW) x Tempo de aplicação(ões), o que determina toda a energia entregue ao tecido, ou seja, representa a quantidade total de excitação que uma biomolécula pode efetivamente alcançar, no caso, a quantidade total de energia ofertada ao tecido (KARU, 2005; TUMILTY *et al.*, 2010). Em meio a tantos outros parâmetros a serem aplicados para que ocorra a resposta tecidual esperada, como densidade de energia (DE), densidade de potência (DP) e área de feixe, somados à diversidade de equipamentos e de descrição de metodologia dos estudos com fototerapia, foi preconizado neste estudo o uso da energia total para fins comparativos com outras pesquisas.

Com relação aos parâmetros citados, empregou-se, no presente estudo, a energia total de 60J, conforme estudo de BONATTI *et al.*, (2013), maior dose encontrada em estudo realizado *in vivo*, até o início da fase experimental do presente estudo.

Visto que não foi encontrado na literatura estudo onde tenha sido realizada aplicação da LLLT previamente a uma incisão, o tempo de aplicação por cinco dias consecutivos foi padronizado de acordo com

tempo de aplicação utilizada por BONATTI *et al.*, (2013), *in vivo*, em ferida incisional, utilizando alta energia.

Com relação à avaliação de vasos sanguíneos, não houve diferença significativa para o tempo de avaliação no período de 3, 7 e 14 dias em cada subgrupo. Assim como, ao comparar os grupos GS, GLV e GLIV, a análise também não revelou diferença significativa nos tempos de avaliação. Esses resultados podem ter sido encontrados devido ao laser ter sido aplicado no período pré-operatório de uma incisão e com alta energia (60J). Já no estudo de BONATTI *et al.* (2013), que utilizou as mesmas doses do presente estudo, foi observado que o número de vasos foi menor no 14º dia, quando comparado ao 7º dia de avaliação, após a utilização de baixa (1,5J) e alta energia (60J) em ferida incisional. Apesar do presente estudo não ter observado um aumento significativo na quantidade de vasos, pode-se inferir que houve uma perfusão microvascular na área de aplicação, apesar de não ter sido o objetivo de estudo. Visto que, KUBOTA & OHSHIRO (1996), após avaliação com *Laser Doppler* em retalho cutâneo, relatam que a LLLT (830nm), com DE 36J/cm², após 30 minutos de irradiação, apresenta um aumento significativo da perfusão microvascular. No estudo de PEREIRA *et al.* (2010), foi observado que existe uma tendência para a promoção da vasodilatação, quando aplicado o laser de 670nm, 4J/cm², na ferida incisional, apesar de não ter sido observado diferença significativa com relação a quantidade de vasos sanguíneos, nos intervalos de 0h, 6h, 12h, 24h e no 3º dia de avaliação.

Utilizando outro recurso biofísico, BORBA *et al.* (2011) observaram que a estimulação elétrica, de polaridade positiva, com aplicação única no período pré-operatório de uma incisão, promove o maior número de vasos

neoformados quando comparado ao grupo controle, não apresentando diferença no 14º dia de avaliação.

Com relação à avaliação de mastócitos, não houve diferença significativa para o tempo de avaliação no período de 3, 7 e 14 dias em cada subgrupo. Assim como, ao comparar os grupos GS, GLV e GLIV, a análise também não revelou diferença significativa nos tempos de avaliação, demonstrando que a aplicação da LLLT previamente a uma incisão não altera a quantidade de mastócitos quando comparado ao padrão fisiológico, o que difere dos achados de PINFILDI *et al.* (2009) que observaram aumento significativo na quantidade de mastócitos, quando realizada a aplicação da LLLT (670nm) e energia de 8,64J, em um único ponto, porém este estudo foi realizado em retalho musculocutâneo transverso do músculo reto do abdome. PINFILDI *et al.* (2014) em outro estudo realizado, observaram um aumento significativo da quantidade de mastócitos, no período de observação de 12h, 24h e 3 dias nos grupos que receberam estimulação com LLLT (830nm), porém este estudo foi realizado em ruptura parcial em tendão de Aquiles e utilizando uma energia baixa de 1,12J, o que difere do presente estudo. Apesar de não termos observado um aumento na quantidade de mastócitos em relação ao padrão fisiológico, como nos estudos acima citados com aplicação da LLLT no pós-operatório e utilizando uma energia baixa, este achado pode ser um resultado relevante, visto que segundo BERGLUND *et al.* (2010) o aumento da quantidade de mastócitos pode contribuir para o desenvolvimento de fibroses e, por conseguinte, o aparecimento de cicatrizes hipertróficas, contraturas em cápsulas articulares, entre outros.

No presente estudo foi observado que o grupo simulação, nos três períodos avaliados, comportou-se dentro do padrão fisiológico, sendo que

no 14º dia foi encontrada uma concentração maior de colágeno total quando comparado aos subgrupos do 3º e 7º dias avaliados. Já os grupos irradiados com laser vermelho e infravermelho não apresentaram o mesmo padrão de comportamento. De acordo com o exposto acima, pode-se inferir que os grupos submetidos ao tratamento com a LLLT, apresentaram alteração na formação do colágeno total quando comparado ao fisiológico. O que corrobora com o estudo de BONATTI *et al.* (2013) que realizaram um estudo *in vivo*, e observaram que energia alta de 60J, no comprimento de onda infravermelho, aplicada por 5 dias consecutivos em ferida incisional em ratos, aumentou o retardo óptico das fibras de colágeno da cicatriz e pele adjacente e reduziu a quantidade de colágeno do tipo I no 7º e 14º dia de avaliação.

Além disso, esses grupos apresentaram um tecido com menos birrefringência, sugerindo, portanto, que a área da cicatriz apresentava maior presença de colágeno imaturo. Com relação aos resultados encontrados, pode-se inferir que a LLLT, quando aplicada por cinco dias na pele íntegra no período pré-incisional, pode promover mudanças no percurso da cicatrização. Alguns autores, que realizaram estudos *in vivo*, observaram mudanças no tecido epitelial íntegro quando aplicado um recurso biofísico, ou seja, foi observado que o tecido apresenta uma resposta fisiológica quando exposto a estímulos externos, como no estudo de HOCHMAN *et al.* (2014), que observaram aumento da substância P, quando realizada aplicação única do laser infravermelho, com energia alta de 40J. Já VISNARDI *et al.* (2007) observaram desorganização das fibras de colágeno em toda a derme, a nível papilar e reticular, quando aplicado o ultrassom em pele íntegra de ratos. Corroborando com o autor citado acima, DE BEM *et al.* (2010) também observaram que o ultrassom em

doses maiores, quando aplicado em pele íntegra, gera alterações na epiderme e derme, respectivamente, aumentando a espessura e a proliferação com adelgaçamento das fibras colágenas.

Sendo assim, as relevantes reduções do colágeno constatadas neste estudo corroboram com os relatos do efeito dose-dependente e cumulativo da LLLT (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; HOURELD & ABRAHAMSE, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2010), em que não foram observadas diferenças em nível celular, mas na síntese de colágeno total, inibida diante da alta dosagem e dias consecutivos de aplicação da irradiação. Esse achado pode ser relevante para tratamento de cicatrizes hipertróficas e quelóide, entretanto quando se pretende estimular a síntese da matriz extracelular (MEC) é conveniente considerar não só a dose aplicada, mas também os intervalos entre cada sessão da fototerapia.

Perspectivas

- Realização de estudos experimentais com delineamento semelhante em porcos;
- Estudos experimentais com outras variações de parâmetros como doses, período, dias, aplicação única e aplicação múltipla;
- Estudos experimentais com outros comprimentos de onda em alta dosagem (superiores a 60J) para avaliação de birrefringência e quantificação de colágeno tipo I e tipo III por imunohistoquímica;

- Estudos clínicos com aplicação da LLLT no espectro vermelho e infravermelho com avaliação pré e pós-operatória;
- Estudos clínicos em pacientes portadores de cicatrizes fibroproliferativas no pré-operatório: realização de LLLT vermelha e infravermelha para avaliação histológica da pele e da cicatriz a serem excisadas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A Terapia Laser de Baixa Intensidade, no período pré-incisional na cicatrização em pele de ratos, diminui a quantidade de colágeno total no 14^o dia.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Akyol U, Güngörmüş M. The effect of low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):51-5

Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL. Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):72-7.

Andrade Fdo S, Clark RM, Ferreira ML. Effects of low-level laser therapy on wound healing. *Rev Col Bras Cir.* 2014 Mar-Apr;41(2):129-33. English, Portuguese.

Berglund ME, Hildebrand KA, Zhang M, Hart DA, Wiig ME. Neuropeptide, mastcell, and myofibroblast expression after rabbit deep flexor tendon repair. *J HandSurg Am.* 2010 Nov;35(11):1842-9.

Bonatti S, Hochman B, Tucci-Viegas VM, Furtado F, Pinfildi CE, Pedro AC, Ferreira LM. In vitro effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts. *Acta Cir Bras.* 2011 Feb;26(1):25-30.

Bonatti S. Terapia a laser de baixa intensidade (808 nm) em baixa e alta dosagem na cicatrização de ferida incisional em pele de ratos [dissertação]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo; 2013.102p.

Borba GC, Hochman B, Liebano RE, Enokihara MM, Ferreira LM. Does preoperative electrical stimulation of the skin alter the healing process? *J Surg Res.* 2011 Apr;166(2):324-9.

Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Brafa A, Campa A, Calabrò M, Campana M, D'Aniello C. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. *In Vivo.* 2010 Mar-Apr;24(2):223-6.

- Chow R, Armati P, Laakso EL, Bjordal JM, Baxter GD. Inhibitory effects of laser irradiation on peripheral mammalian nerves and relevance to analgesic effects: a systematic review. *Photomed Laser Surg.* 2011 Jun;29(6):365-81.
- 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 Apr;25(2):102-6.
- Costa MS, Pinfildi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy with output power of 30 mW and 60 mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):57-61.
- De Bem DM, Maciel CD, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (*in vivo*) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. *Rev Bras Fisioter.* 2010 mar/abr;14(2):114-20.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):514-25.
- Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for invitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008 Aug;24(4):199-210.
- Ferreira LM, Gagnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc.* 2009 Sep;81(3):623-9.
- Ferreira ACB, Hochman B, Furtado F, Bonatti S, Ferreira LM. Keloids: a new challenge for nutrition. *Nut Rev.* 2010 Jul;68(7):409-17.
- Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes T, Longauer F, Sabo J. Histological assessment of the effect of Laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Aug;24(4):480-8.

- Gonçalves RV, Mezêncio JM, Benevides GP, Matta SL, Neves CA, Sarandy MM, Vilela EF. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Apr;43(4):350-5.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008 May;453:314-21.
- Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006 Dec;24(6):705-14.
- Hegde VN, Prabhu V, Rao SB, Chandra S, Kumar P, Satyamoorthy K, Mahato KK. Effect of laser dose and treatment schedule on excision wound healing in diabetic mice. *Photochem Photobiol.* 2011 Nov-Dec;87(6):1433-41.
- Hochman B, Vilas Boas FC, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. *Acta Cir Bras.* 2005 May-Jun;20(3):200-12.
- Hochman B, Farkas Cb, Isoldi Fc, Ferrara Sf, Furtado F, Ferreira Lm. Distribuição de quelóide e cicatriz hipertrófica segundo fototipos de pele de Fitzpatrick. *Rev Bras Cir Plast.* 2012;27(2): 185-9.
- Hochman B, Pinfildi CE, Nishioka MA, Furtado F, Bonatti S, Monteiro PK, Antunes AS, Quierregatto PR, Liebano RE, Chadi G, Ferreira LM. Low-level laser therapy and light-emitting diode effects in the secretion of neuropeptides SP and CGRP in rat skin. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1203-8.
- Hourel NN, Abrahamse H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med Sci.* 2008 Jan;23(1):11-8.
- Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1995;27(3): 219-23.

- Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2005 Nov 1;81(2):98-106.
- Kavros SJ, Miller JL, Hanna SW. Treatment of ischemic wounds with noncontact, low-frequency ultrasound: the Mayo clinic experience, 2004-2006. *Adv Skin Wound Care*. 2007 Apr;20(4):221-6.
- 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.
- Köse O, Waseen A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? *Dermatol Surg*. 2008 Mar; 34(3):336-46.
- Lee KS, Jung JB, Ro YJ, Ryoo YW, Kim OB, Song JY. Effects of x-irradiation on survival and extracellular matrix gene expression of cultured keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 1994 Aug;8(1):33-7.
- Lev-Tov H, Mamalis A, Brody N, Siegel D, Jagdeo J. Inhibition of fibroblast proliferation in vitro using red light-emitting diodes. *Dermatol Surg*. 2013-a Aug;39(8):1167-70.
- Lev-Tov H, Brody N, Siegel D, Jagdeo J. Inhibition of fibroblast proliferation in vitro using low-level infrared light-emitting diodes. *Dermatol Surg*. 2013-b Mar; 39(3 Pt 1):422-5.
- Liebano RE, Ablá LE, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on the viability of ischemic skin flaps in the rat: an amplitude study. *Wound Repair Regen*. 2008 Jan-Feb;16(1):65-9.
- Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*. 2005 Feb;23(1):3-9.
- Mandelbaum SH, Santis EP, Mandelbaum M. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources Part I. *An bras Dermatol*. 2003; 78(4):393-410.

- Moore P, Ridgway TD, Rgbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect wavelenght on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Laser Surg Med.* 2005 Jan;36(1):8-12.
- Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. LED(660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep;27(5):1045-50.
- Peccin MS, Renno AC, de Oliveira F, Giusti PR, Ribeiro DA. Helium-neon laser improves skin repair in rabbits. *J Cosmet Laser Ther.* 2012 Dec;14(6):286-9.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed LaserSurg.* 2010 Jun;28(3):291-325.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2012 Mar;30(3):118-48.
- Pereira MC, de Pinho CB, Medrado AR, Andrade Zde A, Reis SR. Influence of 670nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *J Photochem Photobiol B.* 2010 Mar 8;98(3):188-92.
- Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-neon laser inviability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med.* 2005 Jul;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 Apr;27(2):337-43.
- Pinfildi CE, da Silva ÉP, Folha RA, Turchetto PC, Monteiro PP, Antunes A, Hochman BS. Mast cell curve-response in partial achilles tendon rupture after 830nm phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2014 Feb;32(2):88-92.

- 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 Jun;27(3):411-6.
- Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res.* 2008 Mar-Apr; 29(2):363-8.
- Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jun 26;87(3):145-53.
- Robles DT, Berg D. Abnormal wound healing: keloids. *Clin Dermatol* 2007 Jan-Feb;25(1):26-32.
- Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JB, de Oliveira MG. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):929-35.
- Shu B, Wu Z, Hao L, Zeng D, Feng G, Lin Y. Experimental study on He - Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. *Chin J Traumatol.* 2002 Aug;5(4):246 - 9.
- Silva DFT, Vidal BC, Zezell DM, Zorn TM, Núñez SC, Ribeiro MS. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. *J Biomed Opt.* 2006 Mar-Apr;11(2):024002.
- Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):125-31.
- 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.
- Visnardi, AR. Efeito do ultrassom de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos [dissertação]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2007.106p.

Wang L, Zhang D, Schwarz W. TRPV Channels in Mast Cells as a Target for Low-Level-Laser Therapy. *Cells*. 2014 Jun 26;3(3):662-73.

Webb C, Dyson M. The effect 880 nm of low level laser energy on human fibroblasts: a possible role in hypertrophic wound healing. *J Photoch Photobiol Biol*. 2003 Apr; 70(1):39 -44.

Wood VT, Pinfildi CE, Neves MA, Parizoto NA, Hochman B, Ferreira LM. Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):559-65.

Yasukawa A, Hruji H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci*. 2007 Aug;69(8):799-806.

Zhu KQ, Carrougher GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH. Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen*. 2007 Sep-Oct;15 Suppl 1:S32-9.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

COBEA (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.

Ferreira, LM; Goldemberg S; Nahas, FX; Barbosa, MVJ; Ely, PB. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.84p.

ABSTRACT

Introduction: The healing process involves biochemical and physiological phenomena, any imbalance can result in changes in the scar. **Objective:** To evaluate the Low Level Laser Therapy in the preoperative period of healing in the skin of rats. **Methods:** Were used 90 rats distributed in three groups: Simulation Group (SG); Red Laser Group (RLG) and Infrared Laser Group (ILG), the groups were subdivided into three subgroups, corresponding to 3rd, 7th and 14th days of evaluation. The SG has not received treatment, RLG and ILG 60J energy per point, time 600s. Samples were stained by hematoxylin-eosin for identification of vessels, toluidine blue to mast cells and picrosirius to total collagen. It was applied the two-factor Anova test and Tukey test for comparison of the groups and periods. Being pinned $p \leq 0.05$ the level of rejection of the null hypothesis. **Results:** There was no significant difference regarding the amount of vessels and mast cells between the groups and evaluation periods. There was a significant difference in the evaluation of picrosirius, SG 14th showed a higher concentration of total collagen when compared to SG 3rd and SG 7th. RLG 14th and ILG 14th showed overall decrease in total collagen when compared to SG 14th. **Conclusion:** Low Level Laser Therapy in the preoperative period of healing in rat skin decreases the amount of total collagen.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Randomização dos animais.

A Randomization Plan
 from
<http://www.randomization.com>

1. Grupo SHAM 7 _____
2. Grupo IV 7 _____
3. Grupo IV 7 _____
4. Grupo IV 7 _____
5. Grupo IV 3 _____
6. Grupo IV 14 _____
7. Grupo V 7 _____
8. Grupo V 3 _____
9. Grupo V 14 _____
10. Grupo V 7 _____
11. Grupo IV 7 _____
12. Grupo SHAM 7 _____
13. Grupo V 14 _____
14. Grupo IV 14 _____
15. Grupo SHAM 3 _____
16. Grupo IV 7 _____
17. Grupo IV 14 _____
18. Grupo V 14 _____
19. Grupo V 14 _____
20. Grupo IV 14 _____
21. Grupo SHAM 14 _____
22. Grupo SHAM 7 _____
23. Grupo V 7 _____
24. Grupo IV 7 _____
25. Grupo V 7 _____
26. Grupo IV 3 _____
27. Grupo V 3 _____
28. Grupo IV 14 _____
29. Grupo V 14 _____
30. Grupo IV 3 _____
31. Grupo V 7 _____
32. Grupo V 3 _____
33. Grupo V 3 _____
34. Grupo SHAM 7 _____
35. Grupo V 7 _____
36. Grupo SHAM 14 _____
37. Grupo IV 7 _____
38. Grupo SHAM 14 _____
39. Grupo V 14 _____
40. Grupo IV 3 _____
41. Grupo SHAM 7 _____
42. Grupo IV 14 _____

- 43. Grupo SHAM 3 _____
- 44. Grupo SHAM 14 _____
- 45. Grupo SHAM 7 _____
- 46. Grupo IV 3 _____
- 47. Grupo V 3 _____
- 48. Grupo IV 3 _____
- 49. Grupo IV 7 _____
- 50. Grupo V 14 _____
- 51. Grupo V 7 _____
- 52. Grupo IV 3 _____
- 53. Grupo SHAM 3 _____
- 54. Grupo IV 14 _____
- 55. Grupo SHAM 3 _____
- 56. Grupo IV 14 _____
- 57. Grupo IV 7 _____
- 58. Grupo IV 3 _____
- 59. Grupo SHAM 7 _____
- 60. Grupo V 14 _____
- 61. Grupo V 3 _____
- 62. Grupo V 7 _____
- 63. Grupo IV 3 _____
- 64. Grupo SHAM 14 _____
- 65. Grupo V 14 _____
- 66. Grupo SHAM 3 _____
- 67. Grupo IV 14 _____
- 68. Grupo SHAM 14 _____
- 69. Grupo SHAM 3 _____
- 70. Grupo V 7 _____
- 71. Grupo V 3 _____
- 72. Grupo SHAM 3 _____
- 73. Grupo IV 14 _____
- 74. Grupo SHAM 14 _____
- 75. Grupo SHAM 3 _____
- 76. Grupo IV 3 _____
- 77. Grupo SHAM 7 _____
- 78. Grupo V 3 _____
- 79. Grupo SHAM 3 _____
- 80. Grupo V 7 _____
- 81. Grupo SHAM 14 _____
- 82. Grupo SHAM 14 _____
- 83. Grupo SHAM 14 _____
- 84. Grupo IV 7 _____
- 85. Grupo V 3 _____
- 86. Grupo V 3 _____
- 87. Grupo SHAM 3 _____
- 88. Grupo SHAM 7 _____
- 89. Grupo SHAM 7 _____
- 90. Grupo V 14 _____

90 subjects randomized into 1 block
 To reproduce this plan, use the seed 7390
 Randomization plan created on 16/9/2013 17:37:37

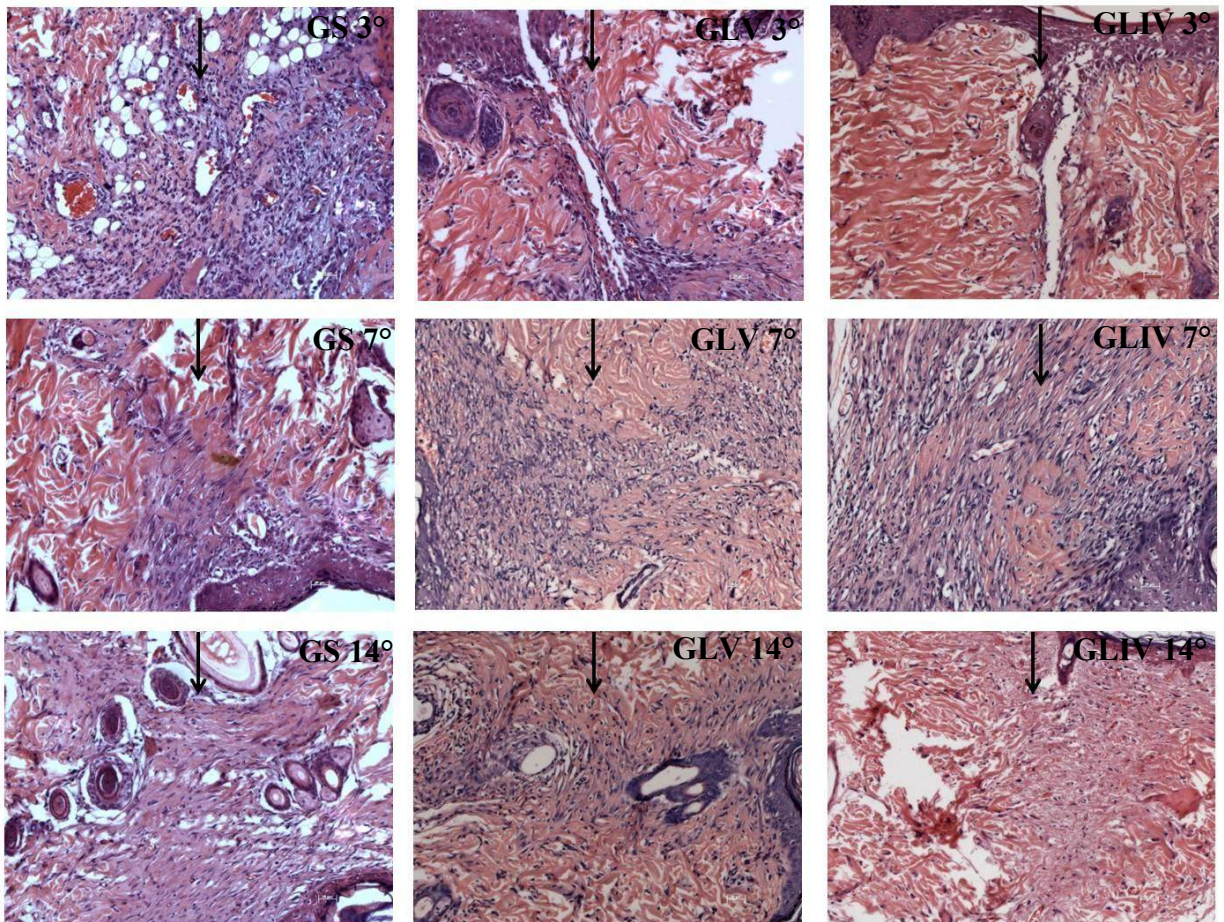
APÊNDICE 2

Classificação por códigos das lâminas.

| GRUPOS | CÓDIGOS |
|---------------|----------------|
| GLV - 14 | M |
| GS -14 | N |
| GLIV - 3 | O |
| GLV - 3 | P |
| GLV - 7 | S |
| GLIV - 7 | T |
| GS - 7 | X |
| GLIV -14 | V |
| GS - 3 | Z |

APÊNDICE 3

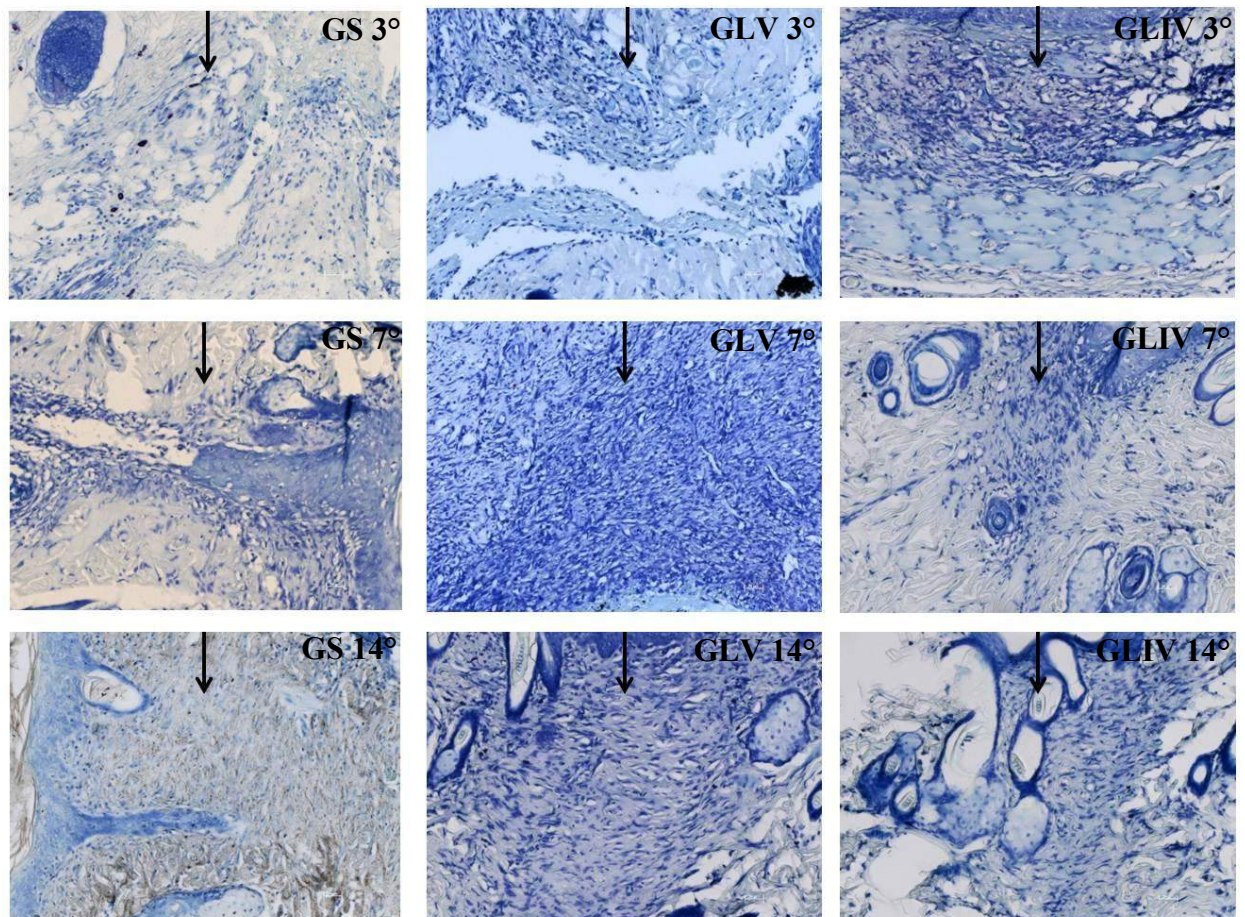
Fotomicrografias das lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina dos grupos do estudo.



Fotomicrografia da avaliação de vasos sanguíneos corado com Hematoxilina-Eosina dos grupos do estudo e seus respectivos períodos de avaliação 3°, 7° e 14° dias. GS: grupo simulação; GLV: grupo laser vermelho; GLIV: grupo laser infravermelho. As setas representam a área da cicatriz. Objetiva de 200X.

APÊNDICE 4

Fotomicrografias das lâminas coradas com Azul de Toluidina dos grupos do estudo.



Fotomicrografia da avaliação de mastócitos corado com Azul de Toluidina dos grupos do estudo e seus respectivos períodos de avaliação 3°, 7° e 14° dias. GS: grupo simulação; GLV: grupo laser vermelho; GLIV: grupo laser infravermelho. As setas representam a área da cicatriz. Objetiva de 200X.

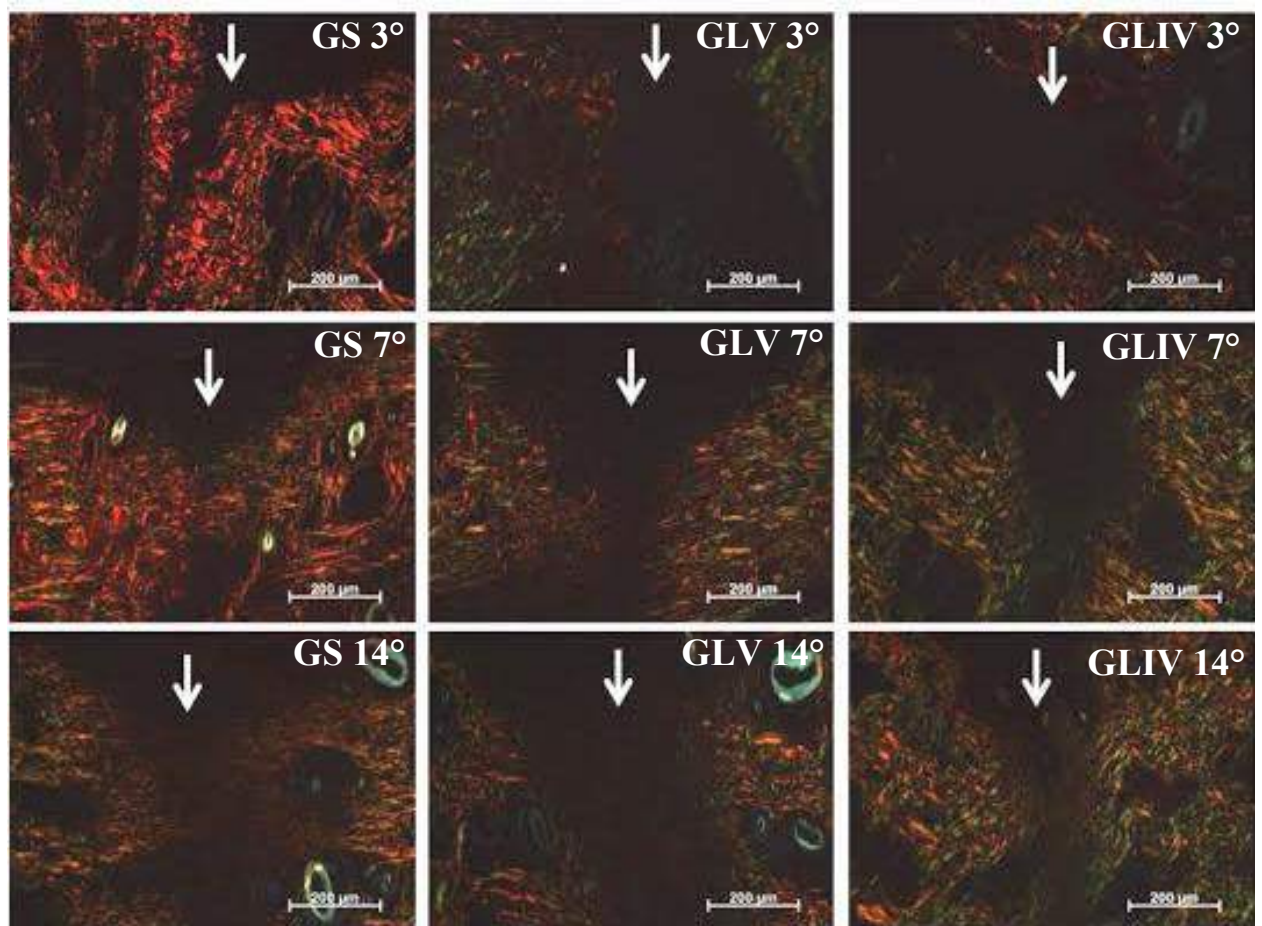
APÊNDICE 5

Modelo utilizado para descrição das avaliações de vasos sanguíneos e mastócitos.

| VASOS | | | | | |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| CÓDIGO DO GRUPO | FOTO 1 | FOTO 2 | FOTO 3 | FOTO 4 | TOTAL |
| M1 | | | | | |
| M2 | | | | | |
| M3 | | | | | |
| M4 | | | | | |
| M5 | | | | | |
| M6 | | | | | |
| M7 | | | | | |
| M8 | | | | | |
| M9 | | | | | |
| M10 | | | | | |

APÊNDICE 6

Fotomicrografias das lâminas coradas por picro sirus dos grupos do estudo.



Fotomicrografia da avaliação de picro sirus dos grupos do estudo e seus respectivos períodos de avaliação 3°, 7° e 14° dias. GS: grupo simulação; GLV: grupo laser vermelho; GLIV: grupo laser infravermelho. As setas representam a área da cicatriz. Objetiva de 100X.

APÊNDICE 7

Modelo utilizado para descrição das avaliações de
picro Sirius.

| PICROSIRIUS | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| CÓDIGO DO GRUPO | AUSÊNCIA - 0 | PRESENÇA - 1 |
| M1 | | |
| M2 | | |
| M3 | | |
| M4 | | |
| M5 | | |
| M6 | | |
| M7 | | |
| M8 | | |
| M9 | | |
| M10 | | |

ANEXOS

ANEXO 1

Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de março de 2012

CEP Nº: 0070/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Paola Karynne Pinheiro Monteiro

Disciplina/Departamento: Disciplina de Cirurgia Plástica

Pesquisadores associados: BERNARDO HOCHMAN; CARLOS EDUARDO PINFILDÍ; RICHARD ELOIN LIEBANO; LYDIA MASAKO;

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: Laser de Baixa Intensidade e diodo emissor de luz em pele de ratos :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos wistar (n=36)

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Investigar o efeito da terapia a laser de baixa intensidade e diodo emissor de luz em pele sadia, de ratos.

RESUMO: Os procedimentos experimentais serão realizados no Laboratório do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela Disciplina de Cirurgia Plástica. Serão utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus*: albinus, Rodentia, Mammalia), machos, adultos, com 8 semanas de idade, 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 terão sua massa corpórea aferida e distribuídos ao acaso, em 3 grupos. A aleatorização será realizada utilizando-se o programa Bioestat 3.0, contendo 12 animais cada grupo. Todos os animais serão submetidos ao procedimento de indicação adotado, correspondente a cada grupo experimental: Grupo 1 (Simulação): simulação da radiação laser de comprimento de onda de 660nm (Al – Ga – Inp) com o equipamento desligado, durante 7 dias consecutivos; Grupo 2 (Laser): radiação laser de comprimento de onda de 660nm (Al-Ga-Inp), com 60mW de potência e energia total 3J, durante 7 dias consecutivos; Grupo 3 (LED): radiação LED de comprimento de onda de 630nm, com 60mW de potência e energia total 3J, durante 7 dias consecutivos. Os animais serão anestesiados com injeção intramuscular, no músculo gastrocnêmio direito, utilizando cloridrato de quetamina (100mg/kg) associado à cloridrato de xilazina (50mg/kg), previamente estabelecida, em doses correspondentes à massa corporal de cada animal. Para aplicação dos mesmos, serão utilizados uma seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 4,5x13mm. No plano anestésico, os animais serão posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha cirúrgica, para realização da tonsura da região dorsal. A área demarcada terá comprimento de 4 cm no sentido crânio caudal, de uma linha a partir do bordo inferior da região escapular. Utilizando um gabarito, onde haverá 3 pontos a partir da extremidade cranial, equidistantes de 1cm. As aplicações da luz laser ou LED serão realizadas após um minuto da demarcação adotada, de acordo com os respectivos grupos, durante 7 dias. Em todos os grupos, a aplicação do laser e LED serão realizadas com a técnica pontual com contato. Um gabarito será utilizado, contendo 3 pontos a partir da extremidade cranial, equidistantes de 1cm. O ponto médio, entre a extremidade cranial e caudal, será a área adotada para a realização da irradiação, mantendo angulação de 90°, perpendicular ao tecido. Ao final do 7º dia, será realizada a eutanásia dos animais por superdosagem de anestésico. A amostra será coletada através de uma biópsia do tecido, retirado do ponto médio, através de um punch de 0,8mm. Em seguida as amostras, serão encaminhadas para análise histológica, morfométrica e imuno-histoquímica.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A fototerapia é alvo de intensas pesquisas e vem demonstrando resultados significantes. Dentre elas destacam – se a terapia laser de baixa intensidade (LLLT), que possibilita o aumento do fluxo sanguíneo, neoangiogênese e diminuição da área de necrose em retalhos cutâneos em estudos experimentais. Vários recursos termofototerapêuticos vêm sendo estudados e amplamente utilizados para fins de tratamentos estéticos, com o objetivo de não causar nenhum dano na epiderme, lesões da derme papilar e reticular, promovendo de forma não – invasiva, uma remodelação do tecido e rejuvenhecimento da pele. Estudos em humanos demonstram que a irradiação com laser não abrasivo (585nm – 1540nm) é uma tecnologia em evolução e evidências indicam a proliferação de fibroblastos, formação de colágeno, espessamento da derme, diminuição anisotrópica da pele e melhora na qualidade e no aspecto visual da pele.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 12 Meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 25/3/2013 e 20/3/2014



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

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



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 31 de julho de 2013

CEP Nº 0070/12

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Paola Karynne Pinheiro Monteiro

Disciplina/Departamento: Disciplina de Cirurgia Plástica

Título do estudo: Laser de Baixa Intensidade e diodo emissor de luz em pele de ratos

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda 1 (versão de 05/07/2013; alteração de título: "terapia laser de baixa intensidade pré-incisional na cicatrização, em pele de ratos"; realização de incisão para melhor elucidação do tema abordado e conforme os resultados, com aplicação clínica-cirúrgica) do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

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



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 24 de fevereiro de 2014

CEP Nº **0070/12**

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Paola Karynne Pinheiro Monteiro

Disciplina/Departamento: Disciplina de Cirurgia Plástica

Título do estudo: Laser de Baixa Intensidade e diodo emissor de luz em pele de ratos

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Adendo 1 (versão de 17/02/2014) Solicitação de modificação na metodologia do projeto de pesquisa. do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

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

ANEXO 2

Laudo Técnico da aferição do aparelho de LLLT utilizado no estudo

São Carlos, 03 de Setembro de 2013

Laudo Técnico

Modelo do Equipamento: Photon Lase III

Número de série: 7254

Os testes mencionados neste laudo possuem a finalidade de atender aos rigorosos padrões de qualidade exigidos pela empresa D.M.C. Equipamentos.

Aferição de Potência:

Estabelece o comparativo entre as Potências determinadas e as Potências medidas.

Temperatura Ambiente: 24,6° C

Medidor Laser utilizado: Coherent LM 10-HTD

Laserterapia:

| Tipo de Laser | λ (nm) | Meio Ativo | Potência Referia | Potência Medida |
|-------------------------|-------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| Vermelho | 660 | IN Ga AL P | 100 mW | 96 mW |
| Infravermelho | 808 | As Ga Al | 100 mW | 94 mW |
| Tipo de Condutor Óptico | Abertura Numérica | Comprimento | Seção Transversal | |
| Fibra Óptica de Silica | 0,48 | 8 cm | 1 mm | |

Avaliação Técnica:

A calibração atende a todos os requisitos do Controle de Qualidade da empresa.


Abelardo Oppermann
Técnico responsável pela calibração

FONTES CONSULTADAS

Academia Brasileira de Letras. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. 5a. ed. São Paulo: Global 2009. 976p. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.academia.org.br/abl/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=2>

Ferreira ABH. Miniaurélio século XXI escolar. 4a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20 (Suppl. 2):02-9.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.

Kitchen S. Eletroterapia baseada em evidências 11a ed. São Paulo: Manole; 2003.

Siegel, S. & Castellan JR, NJ. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. 2ª edição – Artmed – Porto Alegre – 448p. 2006.