

CARLOS EDUARDO PINFILDI

***LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA VIABILIDADE DO
RETALHO MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO MÚSCULO RETO DO ABDOME EM RATOS.***

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – UNIFESP,
para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências.**

**São Paulo
2008**

CARLOS EDUARDO PINFILDI

**LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA VIABILIDADE DO
RETALHO MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO MÚSCULO RETO DO ABDOME EM RATOS.**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - UNIFESP,
para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

CO-ORIENTADORES: Prof. Richard Eloin Liebano

Prof. Bernardo Hochman

São Paulo

2008

Pinfildi, Carlos Eduardo

Laser de baixa intensidade na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome, em ratos./Carlos Eduardo Pinfildi -- São Paulo, 2008.

xxii, 125f.

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

Título em Inglês: Low level laser therapy in viability of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap in rats.

1.terapia a laser de baixa intensidade. 2.retalhos cirúrgicos.
3.necrose. 4.inflamação. 5.vasos sanguíneos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADORA: Prof^ª. Dr^ª. LYDIA MASAÑO FERREIRA

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, IVO e VERA,
por fazerem de suas vidas um grande
exemplo para mim. Por toda compreensão
e carinho, que sem eles, não seria possível
a realização de mais um sonho
compartilhado com vocês.*

*À minha querida e linda avó **ADELAIDE**,
indispensável em todas as horas de minha
vida.*

*Aos meus irmãos, NETO E VIVIANE,
por todo companheirismo, por serem meus
verdadeiros amigos. Pelos momentos
felizes que fizeram desse difícil caminho,
uma doce caminhada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado nos momentos de dificuldades e de felicidades e por me manter sempre no caminho sensato da vida.

À **Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP e orientadora deste trabalho, por ter me guiado e orientado durante todos esses anos, não sendo somente uma orientadora e sim, um exemplo de liderança, profissionalismo e por ser sempre verdadeira nas horas mais difíceis de um Doutorado. Será uma orientadora *ad eternum*.

Ao **Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN**, Coordenador do Curso de Aperfeiçoamento do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP e Co-Orientador deste trabalho, pelo companheirismo e por ter se mostrado um verdadeiro amigo. Agradeço pelos estímulos, críticas e pelos momentos agradáveis que tivemos durante todo esse tempo.

Ao **Prof. Dr. RICHARD ELOIN LIEBANO**, Professor da Universidade Cidade de São Paulo e Co-orientador deste trabalho, pelo grande amigo que é e por ter me acompanhado desde a graduação até o presente momento. Tenho certeza que sempre permaneceremos com essa

amizade. Você realmente faz parte da minha formação profissional e científica.

À **Dra. MILVIA MARIA SIMÕES E SILVA ENOKIHARA**, Doutora pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e Dermatopatologista do Departamento de Patologia da UNIFESP, por toda compreensão, ajuda, empenho e aprendizado nas avaliações das lâminas. Sou muito grato pela disposição e paciência.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE DOS REIS SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela imensa dedicação, carinho e respeito pelo qual me ajudaram durante todos os momentos.

A **Prof^a. MARIA IGNÊS**, Professora de Estatística da Universidade do Triângulo Mineiro - MG, pela análise estatística dos resultados.

Ao grande amigo **MAIRTO ROBERIS GEROMEL**, Técnico em Histologia, Histopatologia, da Faculdade de Medicina de Catanduva – FAMECA e do Instituto Municipal de Ensino Superior de Catanduva – IMES-FAFICA, pelas sugestões, confecção dos blocos de parafina e pelo grande incentivo dado durante a realização deste árduo trabalho.

Ao casal de amigos **Dra. Stella Peccin**, Professora do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Pesquisadora Colaboradora do Centro Cochrane do Brasil e **Prof. Paulo Ricardo Giusti da Silva**, Médico Ortopedista e Diretor da Webtvinterativa

por todo companheirismo, carinho, respeito e orientações dadas na dissertação durante todos esses anos. Um espelho de competência e sucesso profissional. Um dos grandes presentes que recebi ao longo dos anos em São Paulo.

A **Dra. SUELY NONOGAKI**, Pesquisadora Científica da Divisão de Patologia Laboratorial de Imuno-histoquímica (IHQ) do Instituto Adolfo Lutz pela colaboração na confecção das lâminas de IHQ, pelas sugestões e pelo carinho com que me recebeu.

A **Bióloga CINTHYA DOS SANTOS CIRQUEIRA**, bolsista do Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria do Estado da Saúde – Adolfo Lutz, pelo carisma e pela competência na realização das lâminas de IHQ.

Ao grande amigo e irmão **Prof. Ms. RODRIGO PASCHOAL PRADO**, Doutorando do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto, pela imensa disponibilidade com que me ajudou e pelos inúmeros momentos de divertimentos que tivemos e teremos durante toda a vida. A verdadeira amizade se mostra nos momentos em que precisamos dos amigos.

Ao grande amigo e irmão **Prof. Ms. PAULO SERGIO BOSSINI**, Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pela imensa ajuda, pelos

inúmeros finais de semana enfiados no laboratório que foram essenciais para realização desse Doutorado. Você é uma pessoa extraordinária.

Ao grande amigo e irmão **Prof. MARCO AURÉLIO AUGUSTO DE OLIVEIRA PEREIRA**, Cientista da Computação e Professor de Inglês. Sou muito grato pelas revisões de inglês e antes de tudo, você é um grande amigo e companheiro de todas as horas. Todo esse tempo em São Paulo, longe de nossas famílias fez com que nós construíssemos uma família entre nós.

Aos meus grandes amigos **MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES, RAFAEL CORRÊA GOBBATO e RODRIGO LIPPERT**, companheiros de Pós-Graduação e irmãos de todas as horas. Nenhum caminho é longo demais quando os amigos nos acompanham. Vocês foram essenciais para essa longa trajetória.

A **Prof. Dr. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO**, Professor orientador do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar na linha de pesquisa de Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia do Sistema Músculo-Esquelético, pelos incentivos, por ter emprestado o equipamento de laser e por me receber com muito carinho e respeito acreditando sempre em minha pessoa.

A amiga de Pós-Graduação **Prof^ª. Ms. RENATA ANDRADE BITAR**, Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por me ajudar na formatação dos gráficos da análise

estatística. Foi um prazer conhecê-la e que essa amizade que construímos durante esse período seja tão forte quanto aos agradecimentos que faço à voce.

Aos amigos **LUIZ CLÁUDIO e THIAGO INÁCIO** por terem me ajudado e por me ajudar durante todos esses anos que trabalhamos juntos. Obrigado pelas melhorias realizadas nas figuras e organização dos documentos.

Aos amigos e amigas desse Programa de Pós-Graduação:
ALEXANDRE KATALINIC DUTRA, ELAINE KAWANO HORIBE, RENATA ANDRADE BITAR CARTER, ÉRIKA MALHEIROS BASTOS, PIERANGELO ANGELLETTI, ANTONIO CARLOS ALOISE, MARIA LUIZA CHRISTOVÃO RAMOS, MARIA JOSÉ AZEVEDO DE BRITO ROCHA, SIDNEY BANDEIRA CARTAXO, ANDRÉA FERNANDES DE OLIVEIRA, ANA CLAUDIA AMOROSO RIBEIRO DE MAIA, FABIANNE MAGALHÃES PIMENTEL FURTADO, SERGIO TAKEJI MITSUDA, MARIO JORGE WARDE FILHO, GRAZIELA CHACON BORBA, JULIETA MARIA FERREIRA CHACON, VIVIANE TIMM WOOD, TIAGO SILVEIRA E MAÍRA SILVA DA COSTA pela colaboração e críticas realizadas durante o período que passamos juntos.

A todos os Professores Orientadores e Colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP pelas críticas sempre

construtivas que fizeram com que eu aprendesse que tenho muito que aprender durante toda a minha vida. Vocês foram fundamentais para realização desse sonho e serão essenciais daqui pra frente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre a margem de nós mesmo.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	viii
EPÍGRAFE.....	xiv
LISTAS DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xx
RESUMO	xxii
1. INTRODUÇÃO	02
2. OBJETIVO	06
3. LITERATURA	08
4. MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	81
8. REFERÊNCIAS	83
FONTES CONSULTADAS	91
ABSTRACT	93
APÊNDICE	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ponto de aplicação do <i>laser</i> sobre o pedículo do TRAM com fluência de 3J/cm ²	21
Figura 2. Pontos de aplicação do <i>laser</i> (24 pontos) dentro e fora do TRAM com fluência de 3J/cm ²	22
Figura 3. Ponto de aplicação do <i>laser</i> sobre o pedículo do TRAM com fluência de 72J/cm ²	23
Figura 4. Ponto de aplicação do <i>laser</i> sobre o pedículo do TRAM com fluência de 6J/cm ²	24
Figura 5. Pontos de aplicação do <i>laser</i> (24 pontos) dentro e fora do TRAM com fluência de 6J/cm ²	25
Figura 6. Ponto de aplicação do <i>laser</i> sobre o pedículo do TRAM com fluência de 144J/cm ²	26
Figura 7. Demarcação do TRAM nas medidas padrões de 5X3cm, posicionado a 1cm do processo xifóide.....	27
Figura 8. Dissecção do retalho no lado contralateral ao pedículo.....	28
Figura 9. Dissecção do retalho no lado ipsilateral ao pedículo.....	28
Figura 10. Incisão na linha Alba – sentido crânio-caudal.....	29
Figura 11. Incisão margem lateral do músculo reto do abdome.....	29
Figura 12. TRAM pediculado no músculo reto do abdome direito com base na artéria epigástrica direita.....	30
Figura 13. Fixação do TRAM com suturas de referências.....	31
Figura 14. Sutura do TRAM.....	31
Figura 15. Equipamento Laser diodo de baixa intensidade de 670nm (InGaAlP).....	32

Figura 16. Amostras de pele (A e B) retiradas para avaliações de mastócitos e imuno-histoquímica: VEGF e 1A4.....	34
Figura 17a. Molde da área total do TRAM.....	38
Figura 17b. Molde da área de necrose do TRAM.....	38
Figura 18. Distribuição das porcentagens de necrose tecidual do grupo controle (G1) e dos seis grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	42
Figura 19. Distribuição de vasos sanguíneos marcados com 1A4 das amostras A do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	46
Figura 20. Distribuição de vasos sanguíneos marcados com 1A4 das amostras B do grupo controle (G1) e dos seis grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	47
Figura 21a e b. A: Lâmina IHQ - 1A4 com aumento de 100X e B: Lâmina IHQ - 1A4 com aumento de 200X.....	48
Figura 22. Distribuição de VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) das amostras A do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	48
Figura 23. Distribuição de VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) das amostras B do grupo controle (G1) e dos seis grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	51

Figura 24a e b. A: Lâmina IHQ – VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) com aumento de 200X e B: Lâmina IHQ - VEGF com aumento de 400X.....	51
Figura 25. Distribuição dos mastócitos das amostras A do grupo controle (G1) e dos seis grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	52
Figura 26. Distribuição dos mastócitos das amostras B do grupo controle (G1) e dos seis grupos experimentais submetidos a radiação <i>laser</i>	55
Figura 27a e b. A: Lâmina – Azul de Toloidina com aumento de 200X, as setas mostram mastócitos para análise de morfometria. B: Lâmina Azul de Toloidina com aumento de 400X.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem da área de necrose (%).....	41
Tabela 2. Probabilidades relativas a 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b (Teste de Mann-Whitney).....	43
Tabela 3. Probabilidades relativas à 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, para o avaliador 1 (Teste de Kruskal-Wallis).....	44
Tabela 4. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item 1A4 a (Teste de Mann-Whitney).....	45
Tabela 5. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item 1A4 b (Teste de Mann-Whitney).....	47
Tabela 6. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item VEGF a (Teste de Mann-Whitney).....	49
Tabela 7. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item VEGF b (Teste de Mann-Whitney).....	50
Tabela 8. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item Mastócitos a (Teste de Mann-Whitney).....	53
Tabela 9. Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item Mastócitos b (Teste de Mann-Whitney).....	54
Tabela 10. Valores de r e das probabilidades das porcentagens de necrose e aos valores obtidos com 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, nas avaliações feitas com o primeiro avaliador (Coeficiente de Correlação de postos de Spearman).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- TRAM *Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous flap*
- *Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
- nm Nanometros (unidade de medida do comprimento de onda do *laser*)
- He-Ne Hélio Neônio
- AsGaAl Arseneto de Gálio Aluminizado
- mW Miliwatt
- W Watt
- J/cm² Joule por centímetro quadrado
- J Joule
- cm Centímetro
- cm² Centímetro quadrado
- DIEP Artéria epigástrica inferior profunda
- PO Pós-operatório
- LLLT *Low level laser therapy*
- p ponto
- InGaAlP Fosfeto de Índio, Gálio e Alumínio
- E Energia
- μm Micrômetro
- mm Milímetro
- H₂O₂ Água Oxigenada
- PBS *Phosphate buffered saline*
- NaN₃ Azida Sódica

- °C Graus Celsius
- VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*
- 1A4 *Smooth Muscle Actin*
- g gramas
- IHQ Imunohistoquímica

RESUMO

Introdução: A terapia a laser de baixa intensidade tem sido utilizada com o objetivo de aumentar a perfusão vascular de retalhos cutâneos e musculofasciocutâneos. **Objetivo:** Avaliar o efeito da terapia a laser de baixa intensidade na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome em ratos. **Método:** Foram utilizados 84 ratos Wistar-EPM1 que foram randomicamente distribuídos em 7 grupos com 12 animais cada. O Grupo 1 (simulação), grupo 2 ($3\text{J}/\text{cm}^2$ com 1 ponto), grupo 3 ($3\text{J}/\text{cm}^2$ 24 pontos), grupo 4 ($72\text{J}/\text{cm}^2$ 1 ponto), grupo 5 ($6\text{J}/\text{cm}^2$ 1 ponto), grupo 6 ($6\text{J}/\text{cm}^2$ 24 pontos) e grupo 7 ($144\text{J}/\text{cm}^2$ 1 ponto). Todos os grupos experimentais foram submetidos a terapia a laser imediatamente após a realização do TRAM e nos outros dois dias subseqüentes. A porcentagem da área de necrose foi calculada no quarto dia pós-operatório por meio do gabarito de papel. Duas amostras foram coletadas por um punch para realizar as avaliações de mastócitos, vasos sanguíneos (1A4) e VEGF. **Resultados:** Foram encontradas diferenças significantes entre as porcentagens de necrose de todos os grupos, com os valores mais elevados para o grupo 1 comparado aos grupos experimentais. Entre os grupos 3 à 7 não foram encontradas diferenças significantes com $p < 0,292$. Para as avaliações de mastócitos e VEGF os grupos 5 e 7 mostraram um aumento significativo quando comparado aos outros grupos. Para avaliação de vasos sanguíneos (1A4) houve um aumento significativo para os grupos 3 e 5 quando comparado aos outros grupos. **Conclusão:** A terapia a laser de baixa intensidade nas fluências de 6 e $144\text{J}/\text{cm}^2$ foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome em ratos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde um clássico estudo realizado por HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK em (1982), a indicação do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome (*TRAM flap – Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous flap*) tornou-se o uma técnica comum de tecido autógeno para reconstrução da mama (ARNEZ *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2002; ELY & FERREIRA, 2003).

Entretanto, o TRAM ainda não é a solução ideal devido às complicações existentes e indesejadas relacionadas à integridade da parede abdominal e a inadequada perfusão do retalho, ocasionando assim hérnias e perda parcial do retalho, respectivamente (SCHUSTERMAN, PAGE, SARIAN, 1999; BLONDEEL, ARNSTEIN, VERSTRAETE, 2000; HALLOCK, 2001; ZHANG *et al.*, 2001). Essas complicações geralmente levam os pacientes a serem submetidos a novas intervenções, aumentando assim o período de internação e retardando a volta do mesmo às atividades de vida diária (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; NAHABEDIAN *et al.*, 2002).

Na tentativa de pesquisar alternativas no sentido de diminuir essas complicações, estudos com modelos experimentais em porcos, (DORION, BOYD, PANG, 1991; FERREIRA & FERREIRA, 2003) ratos e estudos clínicos (OZGENTAS, SHENAG, SPIRA, 1994; HALLOCK & RICE, 1995) possibilitaram a comparação entre diferentes tipos de retalhos TRAM baseado em diferentes territórios vasculares (NAHABEDIAN *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2004) e associado à utilização de fármacos (CLUGSTON *et al.*, 1995; TYNER T *et al.*, 2006). Concomitante, existem na literatura, diversas pesquisas utilizando diferentes tipos de drogas, como vasodilatadoras, anticoagulantes, antioxidantes, inibidoras de prostaglandinas, bloqueadoras de canais de cálcio e antiadrenérgicas

(JURELL & JONSOON, 1976; KAUFMAN *et al.*, 1985; DUARTE *et al.*, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; GUERARDINI *et al.*, 1999) na tentativa de aumentar a perfusão vascular em retalho cutâneo randômico.

Porém, a utilização de algumas dessas drogas levam a efeitos sistêmicos indesejados, aumentando assim a busca de recursos não farmacológicos, como acupuntura e eletroacupuntura (NIINA *et al.*, 1997), *laser* de baixa intensidade (KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1992; PRADO *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005), correntes elétricas de baixa frequência polarizadas (IM, LEE, HOOPES, 1990; JUNIOR IE *et al.*, 2005) e não polarizadas (LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; KJARTANSSON & LUNDEBERG, 1990). Na tentativa de uma maior segurança e aumento da viabilidade dos retalhos, atualmente, a utilização do *laser* de baixa intensidade tem merecido destaque pela facilidade de aplicação e pelos resultados satisfatórios e animadores (MESTER, MESTER, MESTER, 1985).

De acordo com BAXTER *et al.*, (1991); KITCHEN & PARTRIDGE, (1991); ORTIZ *et al.*, (2001); WOODRUFF *et al.*, (2004) a laserterapia de baixa intensidade tem utilizado *laser* de diodo, devido à facilidade de fabricação e ao baixo custo, ocorrendo assim um crescimento dos estudos relacionados a *laser* de diversos comprimentos de onda, o que determina o tipo do *laser*.

PRADO *et al.* (2005), utilizaram em um estudo o *laser* de diodo infravermelho com comprimento de onda de 830nm, encontrando resultados significantes em relação à diminuição de necrose em retalhos cutâneos em ratos. Já PINFILDI *et al.* (2005), utilizaram um *laser* visível de Hélio-Neônio com comprimento de onda de 632,8nm, encontrando também resultados significantes. Dessa forma, não há um consenso de qual comprimento de onda seria mais eficaz para o aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos isquêmicos.

Com o crescimento da utilização do TRAM nas reconstruções mamárias pós-mastectomia (LIN *et al.*, 2001), há uma vasta gama de estudos experimentais com o propósito de aumentar a viabilidade desses retalhos; porém, não se encontra na literatura estudos que tenham utilizado a terapia a *laser* de baixa intensidade em TRAM.

Por isso, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transversal do reto do abdome (*TRAM*) em ratos.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome em ratos.

LITERATURA

3. LITERATURA

HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982) descreveram a utilização do TRAM com orientação transversa, deixando como marca uma cicatriz semelhante a da plástica abdominal (abdominoplastia), seguindo a linha das dobras cutâneas do abdome inferior e próxima aos limites dos pelos pubianos. Este procedimento deu origem à sigla TRAM. Os autores descreveram as seguintes vantagens do procedimento descrito para a reconstrução mamária.

Excesso de pele e gordura abdominal são comumente disponíveis na maioria das mulheres da faixa etária pós-mastectomia; o retalho musculocutâneo vascularizado axial é confiável; a reconstrução mamária é realizada em um tempo cirúrgico, com a paciente na posição de decúbito dorsal durante a operação inteira (sem mudança de decúbito no transoperatório, como no caso da realização do retalho de músculo grande dorsal); não é necessário o uso de implante mamário, tendo em vista que há volume suficiente de gordura, músculo e pele para serem transpostos e simular uma mama, e a simetria pode ser obtida com mais facilidade; a quantidade de tecidos transferíveis e o seu arco de rotação são de tal forma, que é possível reconstruir inclusive a porção infra-clavicular e a projeção da prega peitoral e um arco de rotação ainda maior pode ser obtido por meio da incisão adicional por meio de seguimentos das cartilagens costais e liberando o pedículo, se necessário.

A melhor estética inerente a reconstrução mamária é realçada pelo procedimento de abdominoplastia e a incisão linear supra-púbica da zona doadora é a mais desejável possível.

O retalho TRAM passou a ser uma das principais opções do arsenal terapêutico em diversos serviços que atuam na área de reconstrução. O desenvolvimento de modelos experimentais possibilitou o estudo mais

aprofundado do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome (TRAM flap).

KERRIGAN (1983) estudou retalhos cutâneos realizados em porcos por meio de microesferas radioativas, com o objetivo de investigar o mecanismo fisiopatológico da necrose do retalho. A perda do retalho poderia dar-se por fatores extrínsecos sistêmicos como infecção, arteriosclerose, hipotensão, má nutrição, e fatores locais como compressão, tensão ou trombose anastomótica do pedículo.

O principal fator intrínseco descrito foi a insuficiência arterial do retalho. A fisiopatologia seria explicada pelo seccionamento dos vasos cutâneos e terminais nervosos simpáticos, provocando uma diminuição do fluxo sanguíneo que no sentido caudal ao longo do retalho. O autor sugeriu que modalidades de tratamento que aumentem o fluxo arterial para o retalho, ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos devem ser escolhidas.

KAMI *et al.* (1985) estudaram os efeitos do *laser* diodo (arseneto de gálio aluminizado) de baixa potência (15mW, 830nm) na viabilidade dos retalhos cutâneos (9 x 3cm) de base caudal, em ratos. Neste estudo, foram utilizados 60 ratos, distribuídos em três grupos (20 ratos em cada). Um grupo foi utilizado como controle, o outro foi irradiado no pré-operatório durante 5 dias e o outro no pós-operatório também por 5 dias. A radiação foi aplicada em 18 pontos horizontais, igualmente distribuída ao longo do retalho. Cada ponto era irradiado por 20 segundos por dia, durante 5 dias consecutivos. A densidade de energia utilizada foi de $16\text{J}/\text{cm}^2$. As áreas dos retalhos foram comparadas e mensuradas 7 dias após a operação.

As áreas de viabilidade dos retalhos foram: no grupo controle de 46,1%, no grupo de radiação pré-operatória foi de 52,5%, e no grupo

irradiado no pós-operatório foi de 53,5%. Neste estudo chegou à conclusão que houve um aumento significativo na área de viabilidade de ambos os grupos submetidos à radiação *laser*, comparados ao grupo controle, e não houve diferença estatisticamente significante entre os dois grupos irradiados.

Segundo os autores, esse aumento na viabilidade dos retalhos ocorreu devido à proliferação de vasos sanguíneos observados ao redor dos pontos irradiados e pelo aumento do fluxo sanguíneo.

SMITH *et al.* (1992) examinaram os efeitos do *laser* de hélio-neônio (com 5mW de potência, 632,8nm) na viabilidade de retalhos cutâneos de base caudal (2 x 7cm) em 20 ratos, e de base medial (2 x 7cm) em 5 porcos. Os ratos foram distribuídos em 2 grupos de 10 cada, sendo o primeiro grupo controle e o outro grupo experimental (grupo irradiado). O grupo experimental foi irradiado uma vez ao dia durante 30s/cm² com a técnica de varredura, durante 10 dias.

Nos porcos, foram realizados 40 retalhos cutâneos de base medial (2 x 7cm) em 5 animais, sendo 4 de cada lado do animal. O delineamento experimental foi similar ao empregado nos ratos. Os retalhos dos grupos experimentais dos ratos e porcos foram irradiados 4 dias no pré-operatório, 10 minutos antes da elevação do retalho (quinto dia) e 5 dias no pós-operatório. A avaliação dos retalhos foi realizada no 5º dia pós-operatório. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e experimental, tanto nos ratos quanto nos porcos.

OZGENTAS *et al.* (1994), publicaram trabalhos sobre o desenvolvimento do modelo do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome no rato e o estudo da dominância vascular. O objetivo do estudo foi desenvolver um modelo animal do retalho

musculofasciocutâneo que mimetizassem o retalho musculofasciocutâneo humano, particularmente sob o aspecto do seu desenho anatômico.

O retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto em humanos é usualmente preparado no abdome inferior, tendo a artéria epigástrica superior como vaso nutriente, e o alto índice de necrose parcial do retalho são atribuídos ao uso deste pedículo não dominante. Os resultados indicam que no modelo do rato, o pedículo vascular da artéria epigástrica superior (cranial) é mais calibroso e contribui mais para a circulação do retalho musculofasciocutâneo do que o sistema inferior caudal; conseqüentemente, os retalhos baseados nos sistema epigástrico superior (cranial) têm áreas de retalhos viáveis maiores do que aqueles baseados no sistema epigástrico inferior (caudal). Os autores concluíram que o modelo do retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome no rato consisti em uma alternativa confiável e de baixo custo para o estudo do retalho. A preparação do retalho no rato pode ser feita rapidamente e não requer habilidades técnicas sofisticadas. Na opinião dos autores, o retalho pediculado inferiormente (caudal) no rato assemelha-se ao retalho musculofasciocutâneo convencional em humanos.

KUBOTA & OHSHIRO (1996) observaram os efeitos da radiação *laser* em retalhos cutâneos de 9 X 3cm com base caudal em ratos, por meio da fluxometria por *laser* Doppler, avaliando a microcirculação no retalho irradiado e a viabilidade dos retalhos. Vinte ratos foram distribuídos em 2 grupos de 10 cada, sendo o primeiro grupo controle, onde foram submetidos a uma falsa radiação. O segundo grupo recebeu a radiação pelo *laser* diodo de arseneto de gálio aluminizado (GaAlAs de 60mW e 830nm) por 1 minuto em um ponto no centro da base do retalho. A densidade de energia utilizada foi de 36J/cm². Todos os animais foram submetidos à

avaliação do *laser* Doppler na pré-irradiação, imediatamente pós-irradiação e 30 minutos pós-irradiação.

No primeiro grupo (controle) não houve alteração na perfusão microvascular na avaliação pré-irradiação, porém imediatamente pós-irradiação e 30 minutos pós-irradiação houve uma diminuição da perfusão microvascular. No segundo grupo (irradiado) não houve alteração na avaliação pré-irradiação e imediatamente pós-irradiação, porém 30 minutos pós-irradiação houve um aumento significativo da perfusão microvascular. Cinco dias pós-irradiação, os ratos foram avaliados e a área de viabilidade do retalho cutâneo do segundo grupo (irradiado) foi significativamente maior comparado com o grupo controle. As áreas de viabilidade dos retalhos foram: Grupo controle 60,8% e do grupo irradiado de 67,9%.

BISHT *et al.* (1999) utilizaram o *laser* de hélio-neônio (632,8nm e 5mW de potência) em 35 ratos, onde realizaram duas incisões de 2cm no dorso do animal, sendo uma em cada lado. As incisões do lado esquerdo foram irradiadas diariamente durante 14 dias, com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ por 5 minutos, servindo como grupo experimental e, as incisões do lado direito não sofreram exposição à radiação, servindo como grupo controle.

Os ratos foram analisados no 3º, 5º, 7º e 14º dia por exame macroscópico e histológico. Também foram submetidos a um teste de resistência do tecido, utilizando um simples sistema de polias com pesos na extremidade.

Os animais do grupo experimental levaram 5 dias para a cicatrização completa das incisões, enquanto os do grupo controle demoraram 7 dias, ocorrendo uma diferença significativa ($p<0,01$). Também houve um aumento significativo ($p<0,01$) na resistência dos tecidos do grupo experimental em comparação com o grupo controle. Observou também que

o grupo submetido à radiação obteve uma precoce epitelização do tecido, com um aumento da reação dos fibroblastos, infiltração leucocitária e neovascularização, somente no local irradiado.

AMIR *et al.* (2000) verificaram os efeitos da radiação *laser* em retalhos cutâneos de 8 x 2,5cm em ratos. Distribuiu-se 30 animais em 3 grupos sendo o grupo 1 controle. O grupo 2 foi irradiado na zona de transição (entre o tecido viável e a área onde se esperava a necrose – 3,5 a 5,5cm da base do retalho). O grupo 3 também foi irradiado nesta mesma zona de transição e na porção distal do retalho (5,5 a 7,5cm da base do retalho).

Os animais do grupo 2 foram irradiados por 5 dias consecutivos após a operação por 5 minutos, totalizando uma dose de 2,9J/cm². Os animais do grupo 3 foram irradiados nas duas regiões acima descritas, por 10 minutos com a mesma quantidade de energia (2,9J/cm²). O equipamento utilizado foi o *laser* de He-Ne com potência de 6mW, comprimento de onda de 632,8nm e área de secção transversa do feixe com 2cm de diâmetro. A avaliação foi realizada dez dias após a última radiação. A análise macroscópica revelou efeitos benéficos da radiação nos grupos 2 e 3, sendo que o grupo 2 apresentou 60% de tecido viável e o grupo 3 apresentou 61,8% de tecido viável. Na análise histológica observou-se um aumento na proliferação de capilares e fibroblastos em relação ao grupo controle. O grupo 3 apresentou um número de vasos sanguíneos significativamente mais elevado do que o grupo 2. Segundo os autores, o principal mecanismo responsável por estes resultados foi a neovascularização. Ainda, este tipo de tratamento deve ser considerado nos casos de pacientes com retalhos que tenham um maior risco de necrose, como os localizados na perna, em pacientes diabéticos ou em casos após lesão do suprimento vascular durante a operação.

SANO *et al.* (2001) relataram que muitos métodos têm sido utilizados para mensurar a área de viabilidade dos retalhos em modelos animais, incluindo planimetria, programas de computador e o método gabarito de papel (conhecido e utilizado por muitos autores). Para isto, os autores estudaram a validade de dois métodos: gabarito de papel e programa de computador (Adobe Photoshop).

Foram utilizados 64 ratos Sprague-Dawley distribuídos ao acaso em 6 grupos de acordo com as diferentes técnicas de TRAM utilizadas. Todos os gabaritos de papel foram escaneados eletronicamente em forma de bitmap. Foi utilizado o software mais comum para esse tipo de avaliação, onde cada bitmap foi colorido correspondendo à área viável e não viável dos retalhos. A partir disso, a soma dos pixels individuais coloridos foram somados para calcular a porcentagem da área de viabilidade dos retalhos.

A comparação de ambos os métodos em 64 ratos mostrou que a área viável do retalho foi levemente maior quando usado o método com software do programa de computador, porém, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo avaliado com o método gabarito de papel ($p=0,479$). Portanto, os autores chegaram a conclusão que tanto o método de gabarito de papel quanto o software do programa de computador são confiáveis para avaliar a viabilidade do TRAM.

KUBOTA (2002) estudou os efeitos do *laser* diodo (830nm) no fluxo sanguíneo em retalhos de base axial e na viabilidade desses retalhos cutâneos em ratos. Os retalhos foram realizados em 40 ratos, e o fluxo sanguíneo foi avaliado mediante a fluxometria pelo *laser* Doppler. Os ratos foram distribuídos em 4 grupos, sendo o grupo 1 controle; o grupo 2 foi irradiado pelo *laser* diodo sobre a artéria iliolumbar (principal vaso de irrigação do retalho); o grupo 3 foi irradiado na metade proximal do retalho

e o grupo 4 foi irradiado na metade distal do retalho. A densidade de energia utilizada foi de $185\text{J}/\text{cm}^2$. O fluxo sanguíneo foi avaliado durante a radiação do *laser* e novamente no 5º e 10º minutos após a radiação, somente neste momento o retalho foi suturado na sua posição de origem. No grupo controle foi realizado o mesmo procedimento; porém não foi irradiado o *laser* de diodo. As áreas de viabilidade dos retalhos foram avaliadas no 5º dia pós-operatório.

A avaliação do fluxo sanguíneo pelo *laser* Doppler demonstrou um aumento significativo no fluxo no 5º e 10º minutos pós-irradiação nos grupos experimentais comparado com o grupo controle. No 5º dia pós-irradiação, houve diferença significativa na área de viabilidade dos retalhos de todos os grupos comparado com o grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Segundo o autor, essa melhora no fluxo sanguíneo e na área de viabilidade seria devido a um possível mecanismo de modulação do sistema nervoso autônomo.

HALLOCK & RICE (2004) estudaram dinamicamente e fisiologicamente diferentes tipos de retalhos: TRAM e (artéria epigástrica inferior profunda) DIEP em ratos. Um TRAM convencional, DIEP com múltiplos vasos e DIEP com um único vaso foram realizados em 3 grupos de 5 cada. Foi utilizado um *laser* Doppler para avaliar a fluxometria que demonstrou o fluxo mais alto na zona I do grupo TRAM (87.6%) do qual apresentou diferença estatisticamente significativa comparado ao DIEP com múltiplos vasos (45.4%) e ao DIEP com único vaso (43.4%) ($p= 0,005$).

O fluxo da zona IV foi proporcionalmente baixo para todos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,736$). Entretanto, a área de viabilidade foi maior para o grupo TRAM (96,1%) quando comparado aos outros dois grupos, DIEP com múltiplos vasos (79,8%) e DIEP com único vaso (77,1%). Esta diferença não foi estatisticamente significativa

($p=0,183$). Os autores concluíram que o fluxo relativo desses modelos com abdome ventral em ratos foi diretamente proporcional ao número de vasos musculocutâneos utilizados, mas o DIEP com um único vaso poderia permitir uma nova área de viabilidade.

PRADO *et al.* (2005) O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do *laser* de diodo na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. A amostragem constituiu-se de 48 ratos da linhagem Wistar-EPM. O retalho cutâneo foi realizado no dorso dos animais com dimensões de 10 x 4cm de base cranial e uma barreira plástica foi interposta entre o mesmo e o leito doador.

O Grupo 1 (controle), foi submetido a uma simulação de tratamento com a irradiação *laser* de diodo (830nm) no POI, PO1, PO2, PO3 e PO4, no mesmo horário. O Grupo 2 foi submetido à irradiação *laser* de diodo no Pré-1, Pré-2, Pré-3, Pré-4 e Pré-5 no mesmo horário e imediatamente após a última irradiação foi realizado o retalho cutâneo. O Grupo 3 recebeu a irradiação *laser* de diodo no POI, PO1, PO2, PO3 e PO4, no mesmo horário e o Grupo 4 foi submetido à irradiação *laser* de diodo no Pré-1, Pré-2, Pré-3, Pré-4, Pré-5 e no POI, PO1, PO2, PO3 e PO4, no mesmo horário. A densidade de energia utilizada foi de $36\text{J}/\text{cm}^2$ e a técnica de aplicação foi pontual com contato, em 1 ponto localizado a 2,5cm da base cranial do retalho.

Nos 4 grupos foram calculadas as porcentagens de área de necrose no sétimo dia pós-operatório mediante a técnica do gabarito de papel. (média de 48,86% no Grupo 1, 36,48% no Grupo 2, 23,14% no Grupo 3 e 31,08% no Grupo 4). Com isso pode-se concluir que o *laser* de diodo foi eficiente no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos e o *laser* de diodo no pós-operatório foi mais eficiente do que os outros grupos experimentais.

PINFILDI *et al.* (2005) verificaram a eficácia do *laser* hélio-neônio (He-Ne) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Foram utilizados 48 ratos, da linhagem Wistar-EPM-1, distribuídos em 4 grupos de 12 animais cada. O retalho cutâneo randômico foi realizado com as medidas de 10 x 4cm, com uma barreira plástica interposta entre o mesmo e o leito doador. O Grupo 1 (controle) foi submetido a simulação de tratamento da radiação *laser* He-Ne. O Grupo 2 foi submetido à radiação *laser* He-Ne, utilizando a técnica pontual com contato sobre o retalho. O Grupo 3 ao redor do retalho e o Grupo 4 sobre e ao redor do retalho. Foi utilizada a densidade de energia de 3J/cm² imediatamente após a operação e nos outros 4 dias subseqüentes. As porcentagens da área de necrose de todos os grupos foram avaliadas no sétimo dia pós-operatório com o método do gabarito de papel.

As médias de área de necrose foram: Grupo 1 - 48,86%, o Grupo 2 - 38,67%, o Grupo 3 - 35,34% e o Grupo 4 - 22,61%. Após a análise estatística, os resultados mostraram que todos os grupos experimentais obtiveram valores estatisticamente significantes em comparação ao grupo controle, e que o Grupo 4 foi o grupo com menor área de necrose comparado à todos os grupos com $p < 0,001$. Com isso chegou-se a conclusão que a radiação *laser* He-Ne foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos e que a técnica de aplicação dentro e fora do retalho (Grupo 4) foi a mais eficaz.

IHSAN (2005) avaliou a eficácia da terapia a *laser* de baixa intensidade (LLLT) sobre a circulação colateral e microcirculação após a oclusão de um vaso sanguíneo. Foram utilizados 34 coelhos adultos distribuídos em dois grupos de 16 cada. O grupo 1 - controle e o grupo 2 - LLLT, no entanto dois ratos foram utilizados como grupo de 0 horas.

Cada animal foi submetido a duas operações: o lado medial de cada

coxa foi cortado, a pele incisionada e a artéria femoral exposta e ligada. O lado da operação no grupo tratado foi submetido à radiação *laser* imediatamente após a operação e nos outros 3 dias subsequentes. Cada sessão da radiação *laser* durava 10 minutos. O *laser* utilizado foi um diodo AsGaAl (Arseneto de Gálio Aluminizado) com comprimento de onda de 904nm e potência de 10mW. Foram coletadas amostras de sangue da artéria femoral e enviadas a avaliação de cromatografia líquida de alto desempenho para determinar os níveis de adenosina, hormônio de crescimento e fator de crescimento de fibroblastos.

Foram coletadas amostras de tecido do lado da operação que constituía da artéria femoral e fibras musculares ao redor, onde foram enviadas para o exame histopatológico para determinar a proporção de fibras/capilares e o diâmetro dos capilares. As amostras de sangue e de tecidos foram coletadas 4,8,12,16,20,24,48,72 horas pós-operatório de ambos os grupos.

No estudo pode-se observar como resultado um rápido aumento no nível de adenosina, hormônio de crescimento e fator de crescimento de fibroblastos. A proporção entre fibras/capilares e diâmetro dos capilares alcançaram o pico na 12^a e 16^a hora PO ($p < 0.001$). Esses níveis caíram gradualmente alcançando os valores normais na 72^a hora PO nos grupos tratados com *laser*. Houve também uma proliferação de vasos colaterais com um aumento dos diâmetros dos vasos originais. Os resultados indicam que o *laser* de baixa intensidade acelerou a circulação colateral e aumentou a microcirculação de tecidos com oclusão de vasos sanguíneos em áreas lesionadas.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Este é um estudo experimental, randomizado, controlado e simples cego. Obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP – CEP n° 1237/05 (apêndice I)

Para a realização do estudo foram utilizados 84 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), adultos, com 3 meses de idade e machos, da linhagem Wistar EPM – 1, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O peso dos animais foi de 280 a 320 gramas. Os procedimentos experimentais foram realizados no Biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, onde os animais foram mantidos individualmente em gaiolas, com ciclo claro/escuro e com controle de temperatura, ração própria comum e água *ad libitum*.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização da pesquisa experimental os 84 ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado por meio do programa de randomização por urna (Urn Randomization – University of Connecticut Health Center) em 7 grupos de 12 animais cada.

Grupo 1 - (Controle Placebo): Os animais receberam simulação da radiação *laser* 670nm, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato; porém, com o equipamento desligado.

Grupo 2 (3J/cm² 1p) - Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato com apenas 1 ponto sobre o pedículo do TRAM (artéria epigástrica inferior). A densidade de energia foi de 3J/cm² e energia total de 0,18J (figura 1).

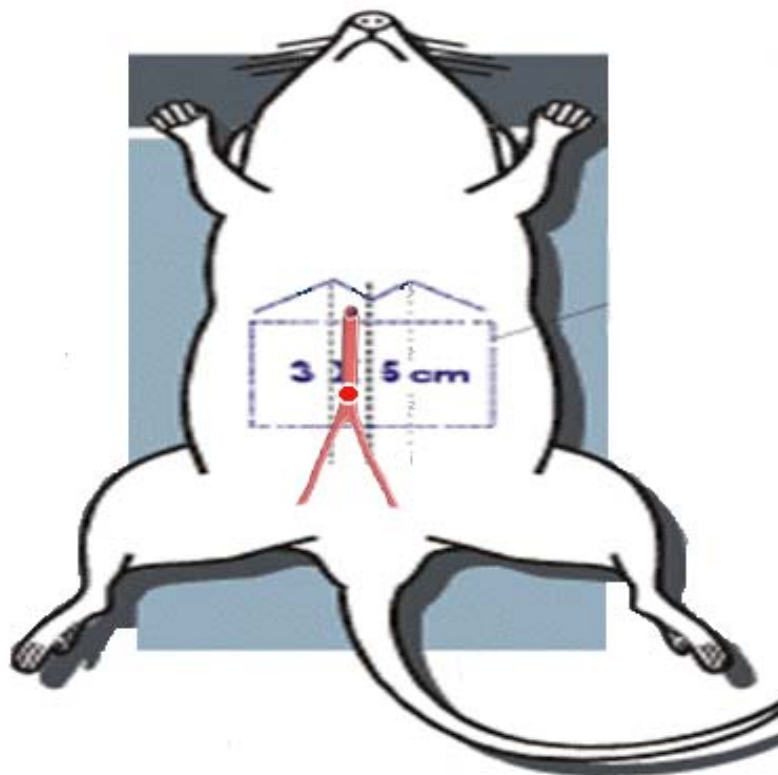


Figura 1. Ponto de aplicação do *laser* sobre o pedículo do TRAM com densidade de energia de 3J/cm².

Grupo 3 ($3\text{J}/\text{cm}^2$ 24p) - Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato com 24 pontos dentro e fora do TRAM. A densidade de energia foi de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total: 4,32J (figura 2).

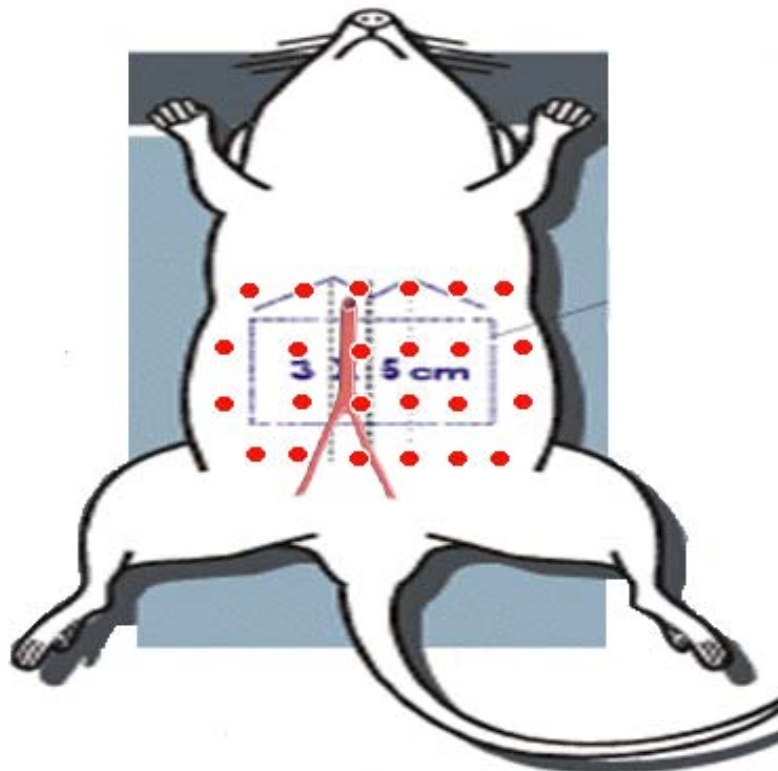


Figura 2. Pontos de aplicação do laser (24 pontos) dentro e fora do TRAM com densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$.

Grupo 4 (72J/cm² 1p) - Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato com apenas 1 ponto sobre o pedículo do TRAM (artéria epigástrica inferior). A densidade de energia foi de 72J/cm² e energia total de 4,32J (figura 3)

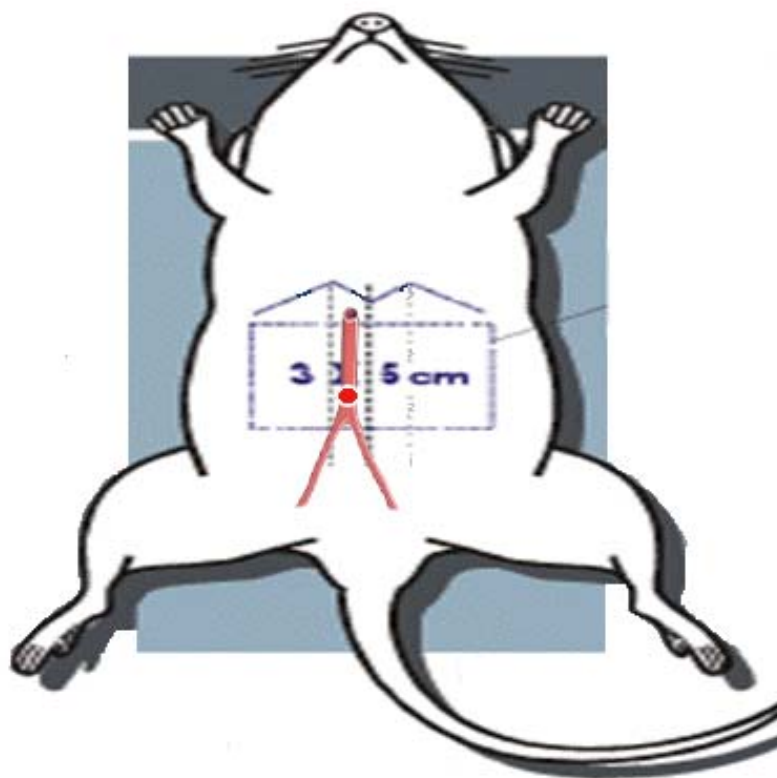


Figura 3. Ponto de aplicação do laser sobre o pedículo do TRAM com densidade de energia de 72J/cm².

Grupo 5 ($6\text{J}/\text{cm}^2$ 1p) - Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato com apenas 1 ponto sobre o pedículo do TRAM (artéria epigástrica inferior). A densidade de energia foi de $6\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de $0,36\text{J}$ (figura 4)

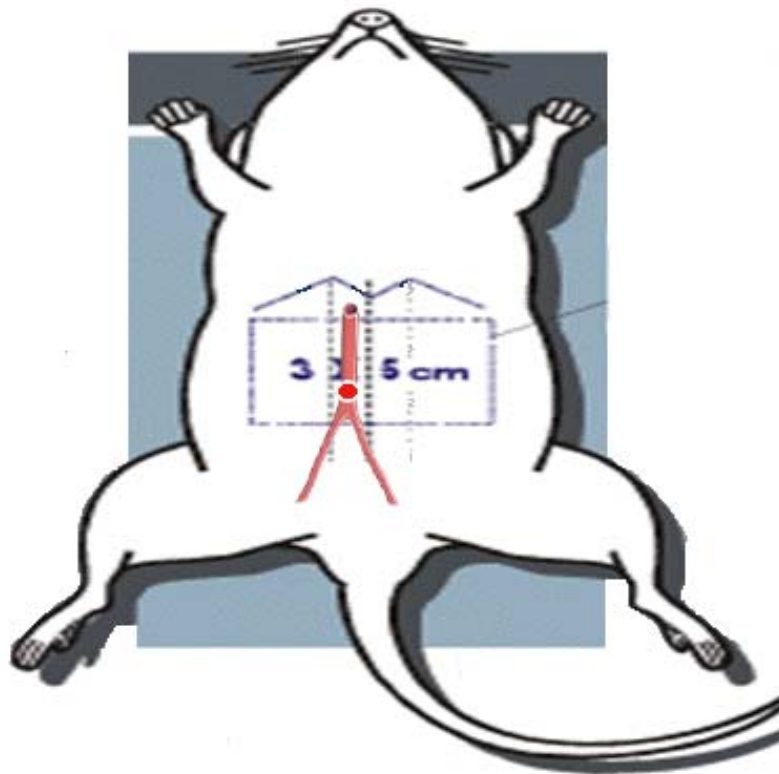


Figura 4. Ponto de aplicação do *laser* sobre o pedículo do TRAM com densidade de energia de $6\text{J}/\text{cm}^2$.

Grupo 6 ($6\text{J}/\text{cm}^2$ 24p) - Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato (24 pontos) dentro e fora do TRAM. A densidade de energia foi de $6\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de $8,64\text{J}$ (figura 5)

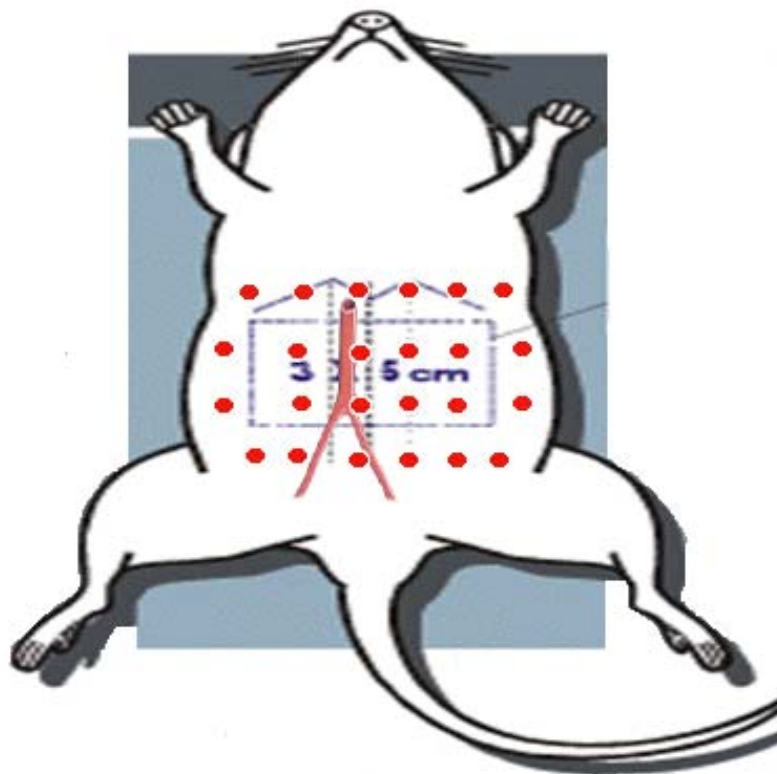


Figura 5. Pontos de aplicação do *laser* (24 pontos) dentro e fora do TRAM com densidade de energia de $6\text{J}/\text{cm}^2$.

Grupo 7 (144J/cm² 1p)- Os animais receberam a radiação *laser*, imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subsequentes. Foi utilizada a técnica pontual com contato com apenas 1 ponto sobre o pedículo do TRAM (artéria epigástrica inferior). A densidade de energia foi de 144J/cm² e energia total de 8,64J (figura 6)

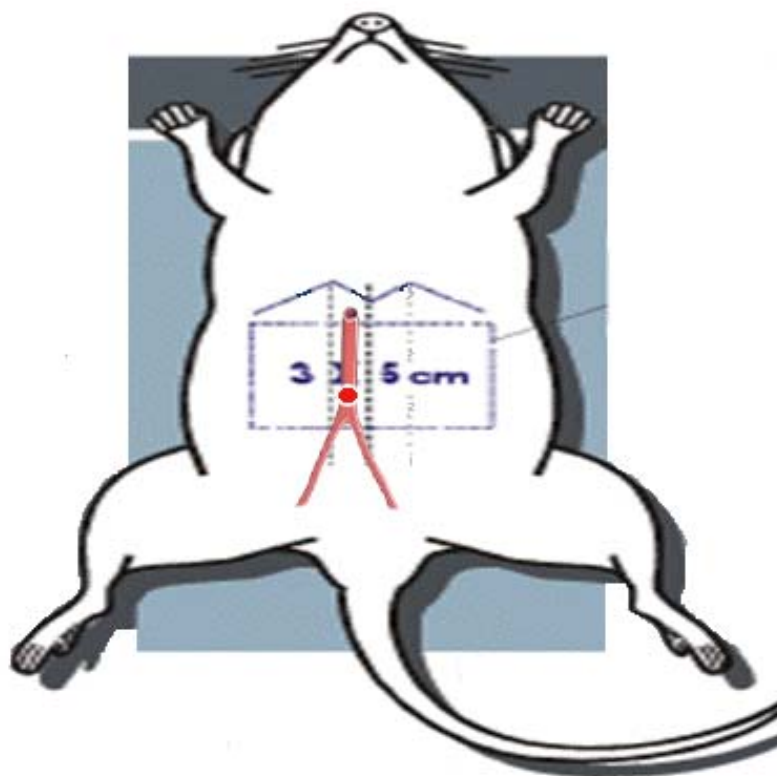


Figura 6. Ponto de aplicação do *laser* sobre o pedículo do TRAM com densidade de energia de 144J/cm².

4.3 TÉCNICA OPERATÓRIA

Para a realização do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome (TRAM), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam com uma dose de 50 mg/kg. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, imobilizados em prancha cirúrgica para realização da

depilação por tração manual dos pelos. O pesquisador que realizou a operação não tinha conhecimento de qual grupo experimental o animal pertencia.

A anti-sepsia foi realizada com álcool iodado a 2% e área delimitada por campo esterilizado. O retalho foi demarcado com as medidas padrão de 5cm no sentido látero-lateral e 3cm no sentido crânio-caudal, posicionado a 1cm (no sentido caudal) do apêndice xifóide (figura 7).

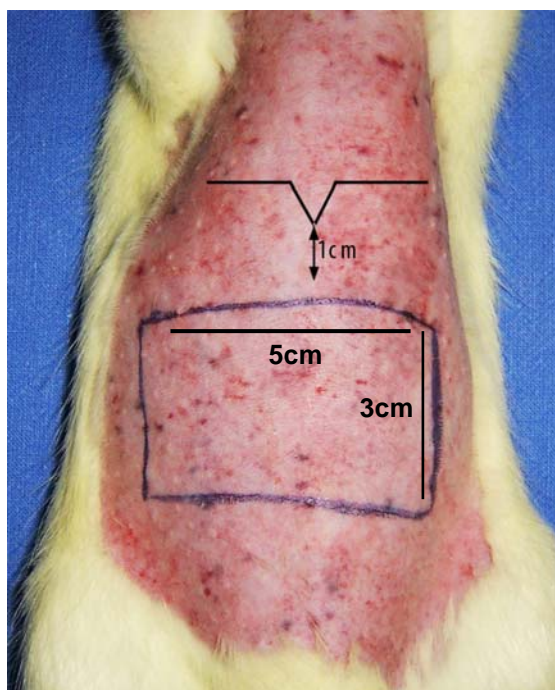


Figura 7. Demarcação do TRAM nas medidas padrões de 5X3cm, posicionado a 1cm do processo xifóide.

Foi realizada a incisão da pele e tecido celular subcutâneo em todo o perímetro do retalho. A seguir, realizou-se a dissecação do retalho no lado contralateral (esquerdo) ao pedículo em sentido látero-medial até a linha mediana (linha Alba) (figura 8).

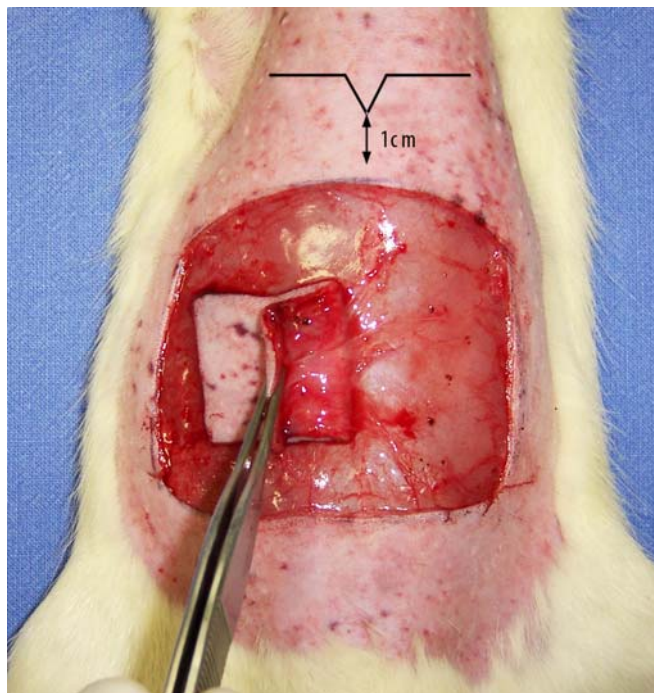


Figura 8. Dissecção do retalho no lado contralateral ao pedículo.

O lado ipsilateral (direito) ao pedículo do retalho, foi dissecado até a margem lateral do músculo reto do abdome direito (figura 9).

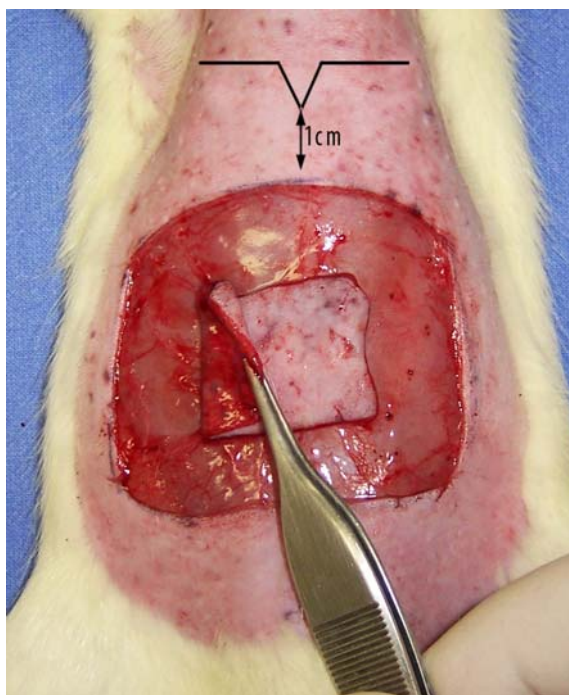


Figura 9. Dissecção do retalho no lado ipsilateral ao pedículo.

O retalho foi liberado mediante incisão na linha alba, no sentido crânio-caudal (figura 10).

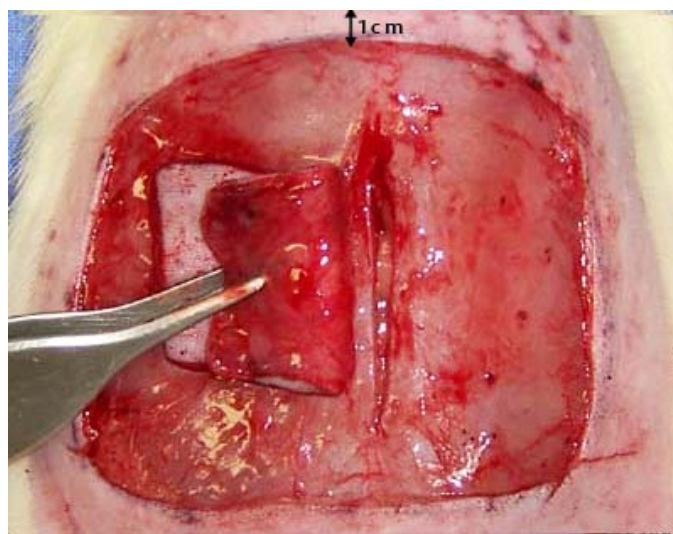


Figura 10. Incisão na linha Alba – sentido crânio-caudal.

A liberação completou-se com a incisão da porção cranial (1cm do processo xifóide - sentido caudal) e da margem lateral do músculo reto do abdome, até o limite caudal da porção demarcada na pele (figura 11).

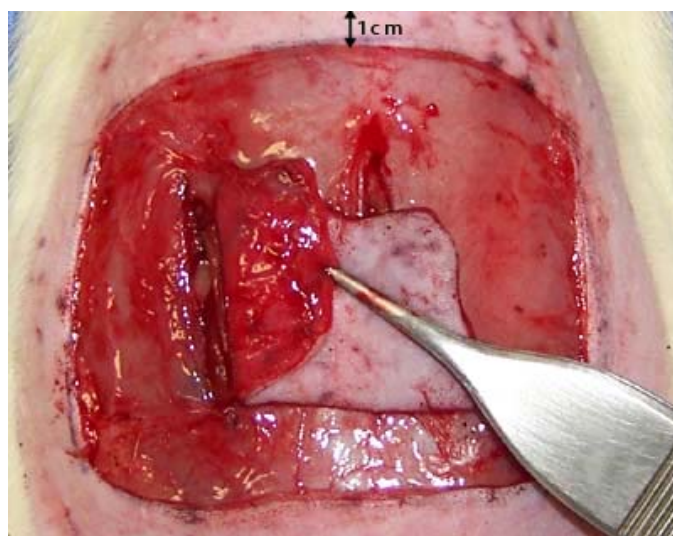


Figura 11. Incisão margem lateral do músculo reto do abdome.

Logo após, o retalho permaneceu pediculado somente no músculo reto do abdome direito, com base na artéria epigástrica caudal direita (figura 12).

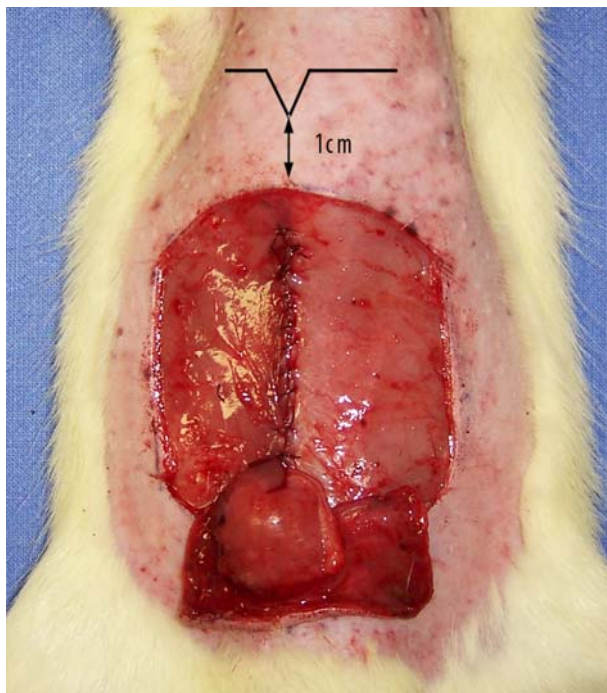


Figura 12. TRAM pediculado no músculo reto do abdome direito com base na artéria epigástrica direita.

Na incisão realizada para a dissecação do músculo do seu leito, foi realizada sutura contínua de náilon 4-0. Logo após, a pele foi suturada com náilon 4-0 com quatro pontos de referência, sendo um em cada vértice do retalho (figura 13).

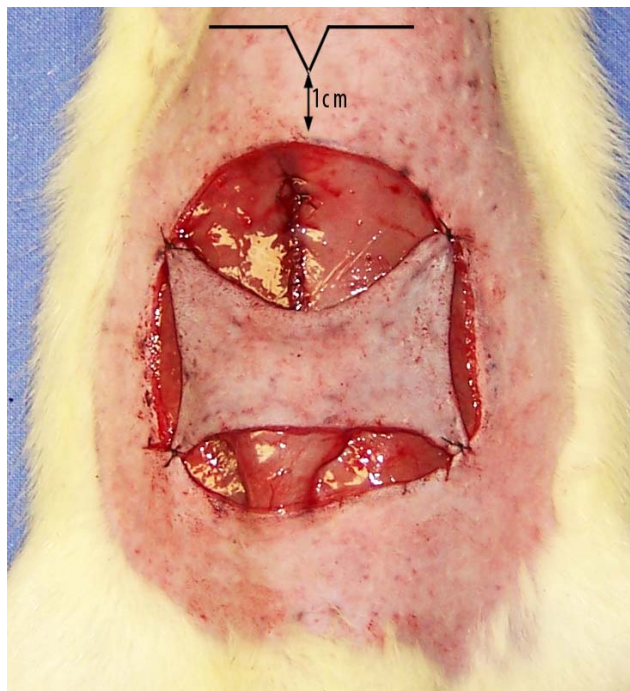


Figura 13. Fixação do TRAM com suturas de referência.

O fechamento da pele foi realizado por sutura contínua com ponto de náilon 5-0, em todo o perímetro do retalho (figura 14).

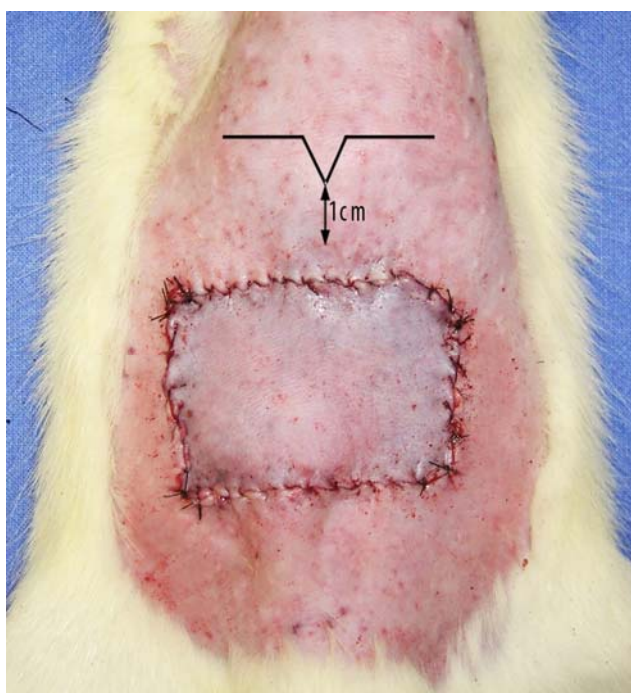


Figura 14. Sutura do TRAM.

4.4 EQUIPAMENTO

Foi utilizado um *laser* diodo de baixa intensidade, visível, com comprimento de onda de 670nm (InGaAlP), potência de pico de 30mW, óculos de proteção, área de secção transversal do feixe de 0,06cm² com feixe contínuo. O equipamento foi aferido pelo Grupo de Óptica da Universidade de São Paulo – USP – Campus de São Carlos (figura 15).



Figura 15. Equipamento *Laser* diodo de baixa intensidade de 670nm (InGaAlP).

4.5 PROCEDIMENTO DA RADIAÇÃO *LASER*

Logo após a realização do *TRAM*, os animais permaneceram anestesiados por 15 minutos e foram submetidos a radiação *laser* de forma randomizada por sorteio com um envelope lacrado.

O Grupo 1 (controle padrão) não foi submetido a nenhum tipo de tratamento, somente a simulação da radiação *laser* com a técnica pontual com contato.

O Grupo 2 foi submetido a radiação *laser* de 670nm com densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=0,18\text{J}$) em um único ponto sobre o pedículo do retalho.

O Grupo 3 foi submetido a 24 pontos de aplicação dentro e fora do retalho com densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=4,32\text{J}$) com a distância de 1cm entre os pontos e a margem do mesmo.

A energia total dos 24 pontos foi aplicada no Grupo 4 com densidade de energia de $72\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=4,32\text{J}$) em um único ponto sobre o pedículo do retalho. (KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005).

O Grupo 5 foi submetido a radiação *laser* de 670nm com densidade de energia de $6\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=0,36\text{J}$) em um único ponto sobre o pedículo do retalho. O Grupo 6 foi submetido a 24 pontos dentro e fora do retalho com densidade de energia de $6\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=8,64\text{J}$) respeitando a mesma distância de 1 cm entre os pontos e a margem do retalho.

A energia total foi aplicada no Grupo 7 com densidade de $144\text{J}/\text{cm}^2$ ($E=8,64\text{J}$) em um único ponto sobre o pedículo do retalho.

A técnica utilizada para a radiação *laser* nos grupos experimentais foi a técnica pontual com contato onde a caneta do *laser* permanece em contato com a pele do animal durante o tempo de aplicação de cada ponto. A caneta deve ser mantida a 90° perpendicular ao retalho.

Foi utilizado um molde plástico sobre o retalho com as demarcações dos pontos onde se realizou a radiação, para que a aplicação fosse realizada sempre no mesmo local.

A radiação *laser* foi realizada imediatamente após a operação e nos outros 2 dias subseqüentes, sendo assim, os animais foram submetidos a 3 dias de aplicação.

No 4º dia pós-operatório os animais foram submetidos a eutanásia por inalação excessiva de éter etílico e logo após foram submetidos à avaliação da porcentagem da área de necrose por meio do método gabarito de papel.

Logo após foram coletadas 2 amostras de pele com um punch de 1cm² para realização das avaliações de vasos endoteliais com os marcadores VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), 1A4 (Actina Alfa de Músculo Liso) para vasos sanguíneos e Azul de Toloidina para mastócitos (figura 16).

A primeira amostra (amostra A) foi retirada a 1 cm da margem inferior do lado ipsilateral ao pedículo (lado direito) do retalho, em sua porção sobre o pedículo 1cm acima da margem caudal do retalho.

A segunda amostra (amostra B) foi extra-retalho, do qual foi retirada à 2cm da margem caudal esquerda do retalho e a 1cm da margem lateral esquerda do mesmo

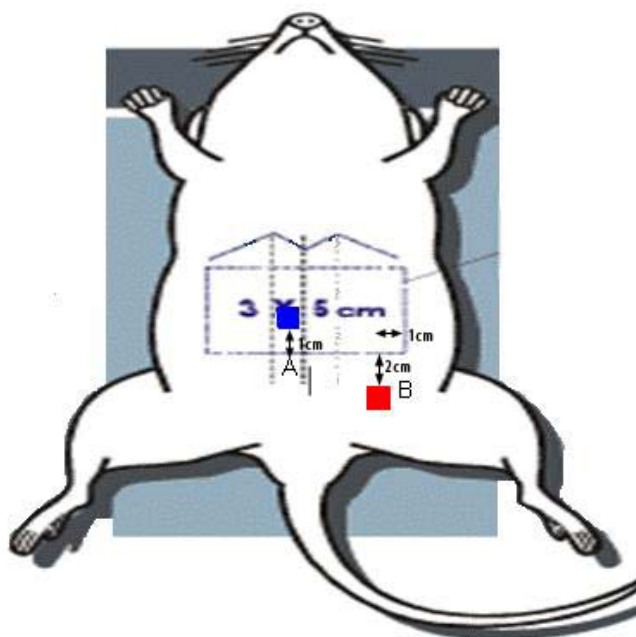


Figura 16. Amostras de pele (A e B) retiradas para avaliações de mastócitos e imunohistoquímica: VEGF e 1A4.

4.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO DE MASTÓCITOS

Após a retirada das amostras do retalho, essas foram colocadas em formal 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 6 banhos de 1 hora cada na solução de álcool a 100%.

Após os banhos em álcool a 100%, as amostras de pele foram diafanizadas em solução de álcool/xilol 1:1 por 1 hora, em seguida passaram por 2 banhos de xilol puro; onde a duração de cada banho foi de 1 hora cada um.

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 2 horas. Posteriormente os blocos foram confeccionados para obtenção dos blocos histológicos.

As amostras de pele inclusas nos blocos de parafina foram cortadas longitudinalmente em cortes semi-seriados com 3 μm por meio de um micrótomo rotativo. Os cortes foram montados em laminais histológicas com lamínulas sobre o tecido. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinadas e hidratadas novamente para serem confeccionadas para coloração de Azul de Toloidina para identificação dos mastócitos.

4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a retirada das amostras do retalho, essas foram colocadas em formal tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas.

Foi realizada a desparafinização dos cortes de 3 μm de espessura do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma, A-3648, EUA), e deixadas por 24 horas em estufa à 60°C. Após isso, as lâminas foram colocadas em xilol a 60°C por 20 minutos, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, etanol 100% 3 vezes por 30 segundos cada passagem, etanol 95% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos e etanol 70% por 30 segundos. Logo após, as lâminas foram lavadas em água corrente e destiladas.

Para recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico 10mM pH 6.0, em fervura na panela de pressão (Eterna, Nigro), por 3 minutos e 30 segundos a partir da pressurização total. Logo após a panela foi resfriada sob água corrente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Logo após foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 6% com 3 trocas de 10 minutos cada e posteriormente lavada novamente em água corrente e destilada.

Após a fase de bloqueio da peroxidase as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos. Logo após, foram incubadas com os anticorpos abaixo listados, diluídos em tampão PBS contendo soro-albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, durante 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 5°C em câmara úmida.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpos	Clone	Diluições	Fabricantes/códigos
VEGF (A-20)	Policlonal feito em coelho	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, EUA – cat# sc152
Smooth Muscle Actin	1A4	1:5000	Dako, Glostrup, Dinamarca, cat# M0851

As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com SuperPicture™ Polymer Detection Kit (Zymed Labs, San Francisco, EUA, cat# 87-8963) por 30 minutos à 37°C. As lâminas foram novamente lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

As lâminas foram reveladas em solução substrato cromógeno: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 100mg% (Sigma, D-5637, EUA); 1mL Dimetilsulfóxido (DMSO); 1mL H₂O₂ 6%; 100mL PBS por 5 minutos à 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas controles foram observadas ao microscópio para o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, com produto final da reação. Após, foram lavadas em água corrente e destiladas. As mesmas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas novamente em água corrente e destilada.

Logo após, foram imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Para a desidratação das lâminas, as mesmas foram imersas em Etanol 50% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 30 segundos cada e xilol 4 vezes por 30 segundos cada. Após esse procedimento as lâminas foram montadas com Entellan Neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

4.8 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE PORCENTAGEM DA ÁREA DE NECROSE DOS RETALHOS

A porcentagem de área de necrose dos retalhos foi verificada no 4º dia após a operação por meio do método do gabarito de papel (SASAKI & PANG, 1980). O limite entre o tecido viável (pele macia, rósea, quente e com pêlos) e o necrosado (pele rígida, escurecida, fria e sem pêlos) foi demarcado nos animais.

Um molde de todo o retalho foi desenhado, onde se delimitará a área necrosada da área viável do retalho e logo após foi recortado em papel transparente vegetal (figura 17a, 17b), sendo a seguir aferido em balança de precisão (erro de +/- 0,0001g).

Foi recortada deste fragmento também, apenas a área correspondente à necrose do retalho que também foi aferida. Em seguida foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{porcentagem da área de necrose do retalho} = \frac{\text{peso do gabarito de papel de necrose do retalho}}{\text{peso do gabarito de papel da área total do retalho}} \times 100$$



Fig.17a. Molde da área total do TRAM



Fig.17b. Molde da área de necrose do TRAM

4.9 MORFOMETRIA PARA AVALIAÇÃO DOS MASTÓCITOS, VEGF E VASOS SANGUÍNEOS.

Foi realizada a leitura das lâminas em microscópio óptico marca Olympus BH-2 com uma lente ocular de 10 x e objetiva de 40 x totalizando um aumento de 400 x. O estudo quantitativo foi realizado por dois pesquisadores utilizando uma lente ocular de 10 x de aumento contendo uma gráticula quadriculada. A gráticula constituída de 100 quadrículos medindo 0,25mm de cada lado foi acoplada ao microscópio óptico e contada somente as células que estavam dentro dos quadrículos e que não ficaram sobrepostas pelas linhas dos mesmos. Para a leitura morfométrica serão observados 5 campos em cada lâmina. Os avaliadores não tinham conhecimento a qual grupo pertencera as lâminas.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado primeiramente o teste Anova (Análise de Variância) para avaliar as diferenças das médias dos sete grupos para porcentagens de necrose e para o peso dos animais.

O Teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar as diferenças entre as médias dos sete grupos para as variáveis de 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b para o avaliador 1.

Também foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney para verificar se houve diferenças entre as médias dos sete grupos para as variáveis de 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b comparadas duas a duas e para diferença entre os dois avaliadores.

Para avaliar se houve correlação entre as porcentagens de necrose e os valores obtidos com 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e

Mastócitos b foi aplicado o Coeficiente de Correlação por Postos de Spearman.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes entre as sete medidas de peso (apêndice II) e, também, entre as sete porcentagens de necrose, foi aplicada a Análise de Variância (GRANER, 1966), aos dados em questão.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Tabela 1. Porcentagem da área de necrose (%)

Anim	Grupo 1 (controle)	Grupo 2 (3J/cm ² 1p)	Grupo 3 (3J/cm ² 24p)	Grupo 4 (72J/cm ² 1p)	Grupo 5 (6J/cm ² 1p)	Grupo 6 (6J/cm ² 24p)	Grupo 7 (144J/cm ² 1p)
01	50	20.98	12.12	9.52	1.07	9.41	5.55
02	31.57	13.63	31.88	9.87	14	4.44	4.91
03	28.57	19.11	11.62	2.32	13	0	0
04	37.77	23.61	4.30	6.89	0	4.44	4.25
05	43.75	16.43	5.12	7.93	24.19	13.63	11.11
06	25.56	29.03	0	5.88	0	14.28	10.86
07	40	35.89	0	18.36	21.34	10	6.38
08	23.58	17.33	11.62	6.66	0	8.51	8.16
09	39.24	37.73	19.60	6.66	5.49	6.81	5.55
10	44.82	13.08	0	9.09	21.12	6.66	11.53
11	29.33	26.08	3.03	6.97	10.44	7.69	19.14
12	56.06	22.5	15.38	9.30	5.94	10.41	13.63
Média	37.49%	22.95%	9.55%	8.28%	9.71%	8.57%	8.42%

G1 > G2,G3,G4,G5,G6,G7 (p<0,000*)

G3>G4<G5>G6>G7 (p<0,292*)

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 1, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as porcentagens de necrose, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos com o grupo 1 (37,49%), que superaram todos os outros valores. Em seguida, os valores mais elevados foram os do grupo 2 (22,95%), que superaram todos

os outros valores, do grupo 3 (9,55%) ao grupo 7 (8,42%) (figura 18). Entre os grupos de nº 3 ao de nº 7 não foram encontradas diferenças estatisticamente significante com $p < 0,292$.

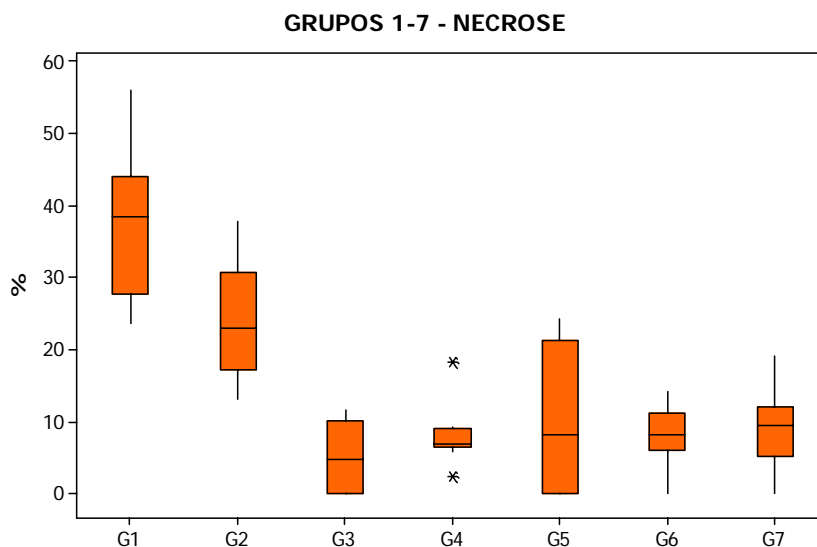


Figura 18: Distribuição das porcentagens de necrose tecidual do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

Com o intuito de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significante entre as duas avaliações efetuadas, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975), aos valores relativos a 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b (tabela 2).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Tabela 2. Probabilidades relativas a 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis analisadas	Probabilidades
1A4 a	0,851
1A4 b	0,062
VEGF a	0,078
VEGF b	0,444
Mastócitos a	0,248
Mastócitos b	0,108

De acordo com os resultados demonstrados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois avaliadores (apêndice II).

Com isso foi utilizado somente os dados do avaliador 1 para o restante da análise estatística.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significante entre as médias dos sete grupos referente a 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, para o avaliador 1, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975), aos valores obtidos (tabela 3).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Tabela 3 – Probabilidades relativas à 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, para o avaliador 1 (Teste de Kruskal-Wallis).

Variáveis Analisadas	Probabilidades
1A4 a	0,000*
1A4 b	0,003*
VEGF a	0,005*
VEGF b	0,002*
Mastócitos a	0,010*
Mastócitos b	0,038*

(*) $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre todos os valores dos sete grupos comparados, relativos ao primeiro avaliador.

Como o teste de Kruskal-Wallis não indica a direção das diferenças, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney, às médias dos sete grupos, comparadas duas a duas, considerando-se apenas os itens em que o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças estatisticamente significantes (tabela 4).

Tabela 4 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item 1A4 a (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	1A4 médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	2,9 X 1,8	0,001*
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	2,9 X 3,5	0,000*
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,9 X 2,7	0,000*
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,9 X 2,7	0,000*
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,9 X 3,3	0,000*
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,9 X 4,0	0,000*
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,8 X 3,5	0,001*
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,8 X 2,7	0,000*
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,8 X 2,7	0,004*
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,8 X 3,3	0,000*
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,8 X 4,0	0,000*
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	3,5 X 2,7	0,954
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	3,5 X 2,7	0,793
G3 (3J/cm ² 24p) x G6 (6J/cm ² 24p)	3,5 X 3,3	0,977
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	3,5 X 4,0	0,977
G4 (72J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,7 X 2,7	1,000
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,7 X 3,3	0,862
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,7 X 4,0	0,862
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,7 X 3,3	0,839
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,7 X 4,0	0,885
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	3,3 X 4,0	1,000

(*) $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 1 (Controle), comparado com grupos 2, 4 e 5, apresentou resultados mais elevados; quando comparado com os grupos 3, 6 e 7, apresentou resultados menos elevados;

- grupo 2, comparado com todos os outros grupos, apresentou resultados menos elevado, nos cinco casos (figura 19).

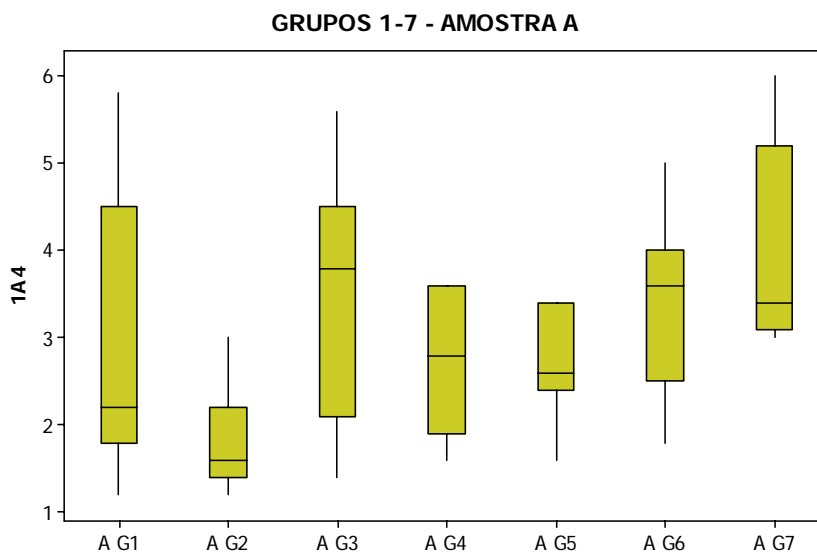


Figura 19: Distribuição de vasos sanguíneos marcados com 1A4 das amostras A do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

De acordo com os resultados demonstrados na figura 20, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 2, quando comparado com os grupos 3 e 4, apresentou resultados mais elevados; quando comparado com os grupos 5, 6 e 7, apresentou resultados menos elevados;

- grupo 7, quando comparado com os grupos 4 e 5, apresentou resultados mais elevados e significantes com $p < 0,046$ e $p < 0,013$ respectivamente (tabela 5).

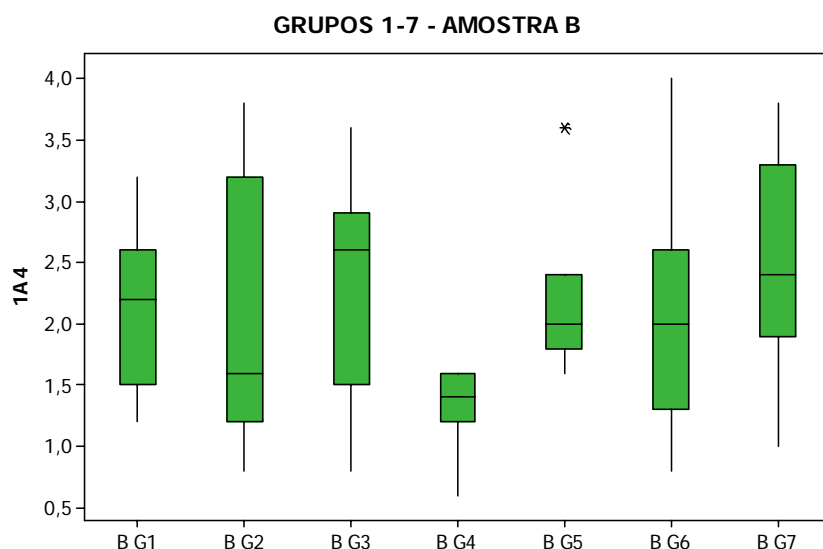


Figura 20: Distribuição de vasos sanguíneos marcados com 1A4 das amostras B do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

Tabela 5 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item 1A4 b (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	1A4 médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	2,1 X 2,0	0,069
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	2,1 X 2,2	0,452
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,1 X 1,3	0,929
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,1 X 2,1	0,657
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,1 X 2,0	0,425
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,1 X 2,5	0,070
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	2,0 X 2,2	0,010*
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,0 X 1,3	0,013*
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,0 X 2,1	0,008*
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,0 X 2,0	0,002*
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,0 X 2,5	0,000*
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,2 X 1,3	0,120
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,2 X 2,1	0,169
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,2 X 2,5	0,658
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,3 X 2,0	0,120
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,3 X 2,5	0,046*
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,1 X 2,0	0,101
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,1 X 2,5	0,013*
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,0 X 2,5	0,424

(*) $p < 0,05$

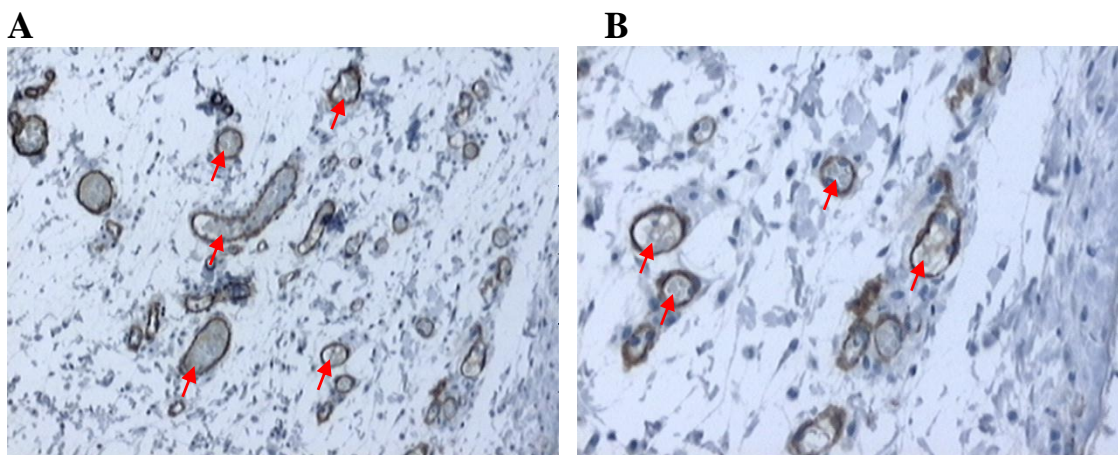


Figura 21 – **A:** Lâmina IHQ - 1A4 com aumento de 100X e **B:** Lâmina IHQ - 1A4 com aumento de 200X. As setas mostram vasos sanguíneos marcados por *smooth muscle actine*

De acordo com os resultados demonstrados na figura 22, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 1, quando comparado com todos os outros grupos, apresentou resultados menos elevados;
- grupo 4, quando comparado com os grupos 5 e 7, apresentou resultados menos elevados;
- grupo 6, quando comparado com os grupos 5 e 7, apresentou resultados menos elevados (tabela 6).

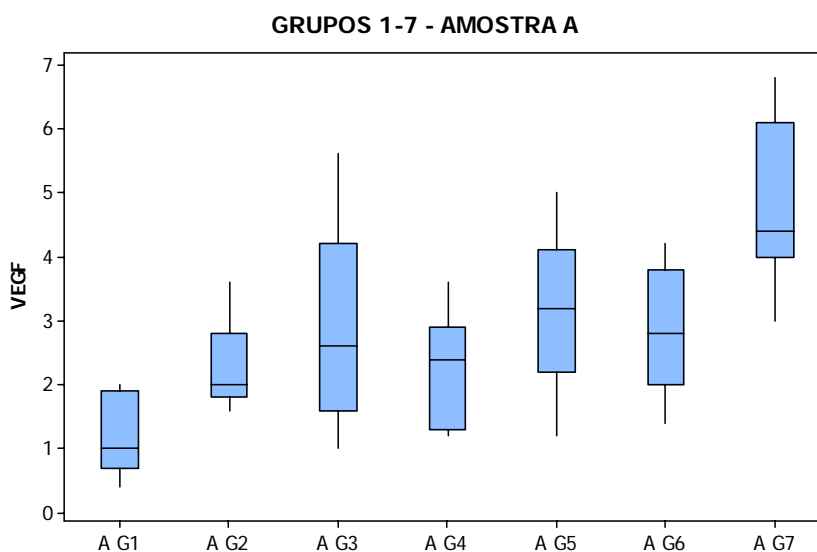


Figura 22: Distribuição de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) das amostras A do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

Tabela 6 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item VEGF a (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	VEGF médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	1,2 X 2,2	0,012*
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,2 X 2,8	0,015*
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,2 X 2,2	0,013*
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,2 X 3,2	0,003*
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,2 X 2,9	0,013*
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,2 X 4,8	0,003*
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	2,2 X 2,8	0,722
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,2 X 2,2	1,000
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,2 X 3,2	0,092
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,2 X 2,9	1,000
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,2 X 4,8	0,092
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	2,8 X 2,2	0,452
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,8 X 3,2	0,565
G3 (3J/cm ² 24p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,8 X 2,9	0,452
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,8 X 4,8	0,565
G4 (72J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	2,2 X 3,2	0,046*
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,2 X 2,9	1,000
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,2 X 4,8	0,046*
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	3,2 X 2,9	0,046*
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	3,2 X 4,8	1,000
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,9 X 4,8	0,046*

(*) $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 7, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 4, quando comparado com o grupo 6, apresentou resultados menos elevados;
- grupo 7, quando comparado com todos os outros grupos, apresentou resultados mais elevados, nos seis casos (figura 23).

Tabela 7 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item VEGF b (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	VEGF médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	1,9 X 1,7	0,625
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,9 X 1,6	0,166
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,9 X 1,4	0,169
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,9 X 2,0	1,000
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,9 X 2,0	0,560
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,9 X 3,1	0,006*
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,7 X 1,6	0,247
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,7 X 1,4	0,247
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,7 X 2,0	0,755
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,7 X 2,0	0,175
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,7 X 3,1	0,001*
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,6 X 1,4	0,858
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,6 X 2,0	0,212
G3 (3J/cm ² 24p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,6 X 2,0	0,061
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,6 X 3,1	0,004*
G4 (72J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,4 X 2,0	0,198
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,4 X 2,0	0,040*
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,4 X 3,1	0,001*
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	2,0 X 2,0	0,471
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,0 X 3,1	0,019*
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	2,0 X 3,1	0,007*

(*) $p < 0,05$

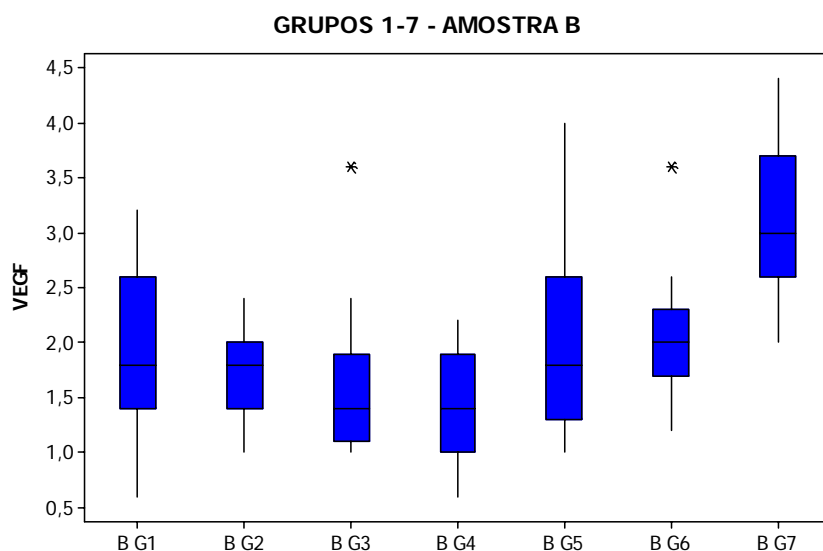


Figura 23: Distribuição de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) das amostras B do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação laser.

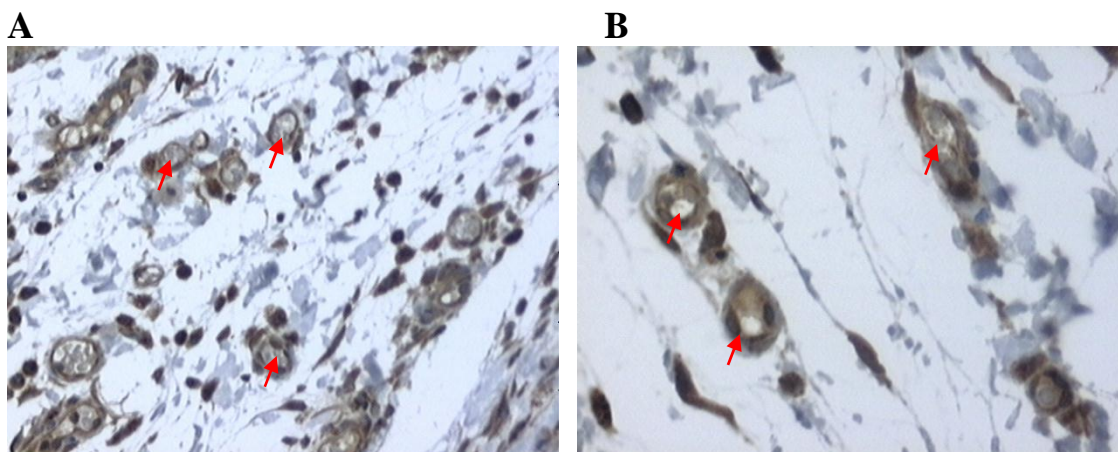


Figura 24 – A: Lâmina IHQ – VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) com aumento de 200X e **B:** Lâmina IHQ – VEGF com aumento de 400X. As setas mostram pequenos vasos sanguíneos que possuem fator de crescimento endotelial.

De acordo com os resultados demonstrados na figura 25, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 1, quando comparado com os grupos 5 e 7, apresentou resultados menos elevados;
- grupo 2, quando comparado com os grupos 5, 6, e 7, apresentou resultados menos elevados;

- grupo 4, quando comparado com o grupo 7, apresentou resultados menos elevados (tabela 8).

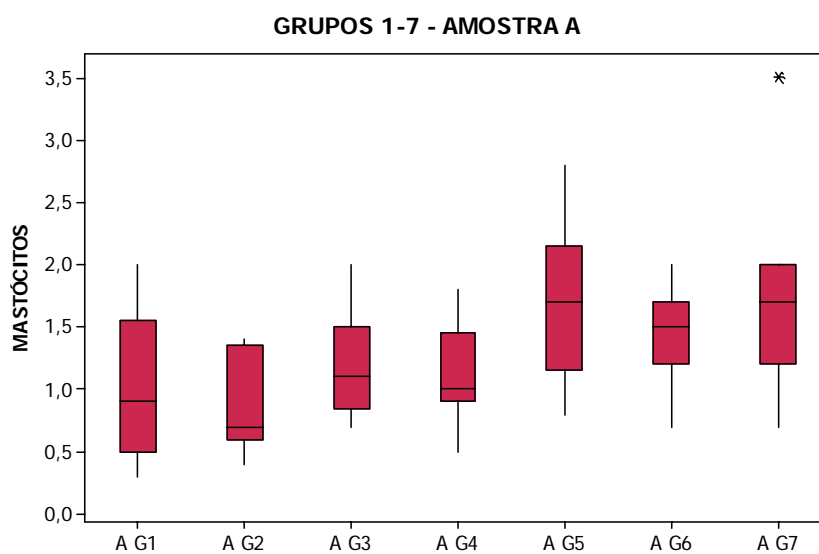


Figura 25: Distribuição dos mastócitos das amostras A do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

Tabela 8 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item Mastócitos a (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	Mastócitos médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	1,0 X 0,9	0,723
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,0 X 1,1	0,352
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,0 X 1,1	0,399
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,0 X 1,7	0,027*
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,0 X 1,4	0,084
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,0 X 1,7	0,042*
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	0,9 X 1,1	0,184
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	0,9 X 1,1	0,308
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	0,9 X 1,7	0,007*
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	0,9 X 1,4	0,008*
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	0,9 X 1,7	0,008*
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,1 X 1,1	0,756
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,1 X 1,7	0,069
G3 (3J/cm ² 24p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,1 X 1,4	0,184
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,1 X 1,7	0,092
G4 (72J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,1 X 1,7	0,051
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,1 X 1,4	0,110
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,1 X 1,7	0,042*
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,7 X 1,4	0,307
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,7 X 1,7	0,824
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,4 X 1,7	0,423

(*) $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 9, foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre:

- grupo 2, quando comparado com os grupos 3 e 5, apresentou resultados menos elevados;
- grupo 3, quando comparado com os grupos 4 e 7, apresentou resultados mais elevados;
- grupo 5, quando comparado com os grupos 4 e 7, apresentou resultados mais elevados (figura 26).

Tabela 9 – Probabilidades relativas ao primeiro avaliador, no item Mastócitos b (Teste de Mann-Whitney).

Variáveis Analisadas	Mastócitos médias	Probabilidades
G1 (Controle) x G2 (3J/cm ² 1p)	1,1 X 0,8	0,184
G1 (Controle) x G3 (3J/cm ² 24p)	1,1 X 1,3	0,111
G1 (Controle) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,1 X 1,0	0,756
G1 (Controle) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,1 X 1,4	0,144
G1 (Controle) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,1 X 1,0	0,894
G1 (Controle) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,1 X 1,0	0,534
G2 (3J/cm ² 1p) x G3 (3J/cm ² 24p)	0,8 X 1,3	0,021*
G2 (3J/cm ² 1p) x G4 (72J/cm ² 1p)	0,8 X 1,0	0,248
G2 (3J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	0,8 X 1,4	0,024*
G2 (3J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	0,8 X 1,0	0,181
G2 (3J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	0,8 X 1,0	0,330
G3 (3J/cm ² 24p) x G4 (72J/cm ² 1p)	1,3 X 1,0	0,046*
G3 (3J/cm ² 24p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,3 X 1,4	0,894
G3 (3J/cm ² 24p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,3 X 1,0	0,083
G3 (3J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,3 X 1,0	0,037*
G4 (72J/cm ² 1p) x G5 (6J/cm ² 1p)	1,0 X 1,4	0,042*
G4 (72J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,0 X 1,0	0,476
G4 (72J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,0 X 1,0	0,722
G5 (6J/cm ² 1p) x G6 (6J/cm ² 24p)	1,4 X 1,0	0,109
G5 (6J/cm ² 1p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,4 X 1,0	0,030*
G6 (6J/cm ² 24p) x G7 (144J/cm ² 1p)	1,0 X 1,0	0,229

(*) $p < 0,05$

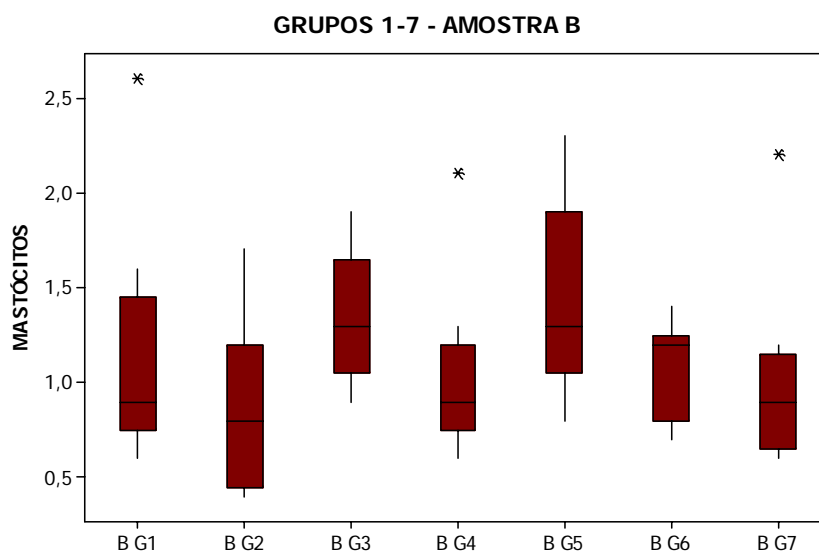


Figura 26: Distribuição dos mastócitos das amostras B do grupo controle (G1) e dos 6 grupos experimentais submetidos a radiação *laser*.

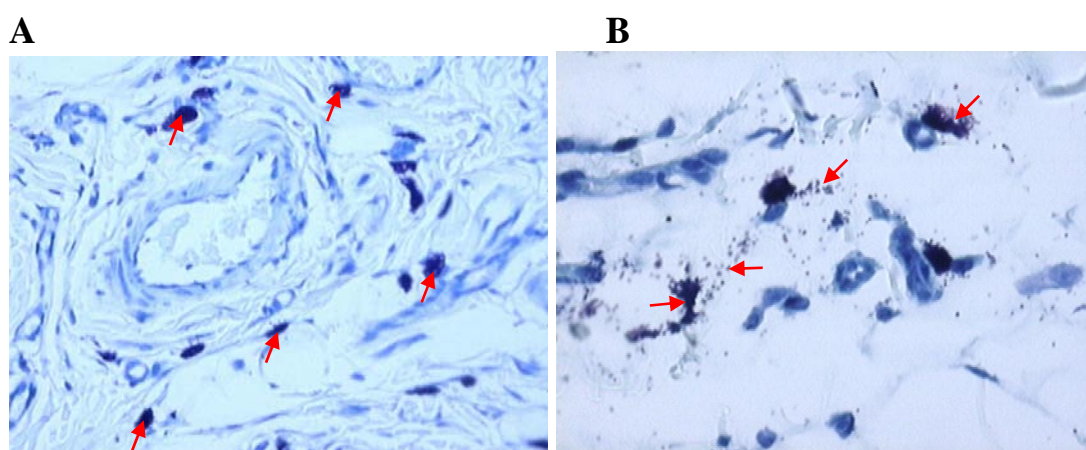


Figura 27 – A: Lâmina – Azul de Toloidina com aumento de 200X, as setas mostram mastócitos para análise de morfometria. **B:** Lâmina Azul de Toloidina com aumento de 400X. As setas mostram a degranulação dos mastócitos e os respectivos granulos.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de correlações estatisticamente significantes entre as porcentagens de necrose e os valores obtidos com 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, foi aplicado o Coeficiente de Correlação por Postos de Spearman às avaliações feitas com o primeiro avaliador (tabela 10).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Tabela 10 – Valores de r e das probabilidades das porcentagens de necrose e aos valores obtidos com 1A4 a, 1A4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, nas avaliações feitas com o primeiro avaliador (Coeficiente de Correlação por Postos de Spearman).

Variáveis Analisadas	Valores de r	Probabilidades
Necrose x 1A4 a	-0,091	0,476
Necrose x 1A4 b	0,091	0,478
Necrose x VEGF a	-0,323	0,010*
Necrose x VEGF b	-0,128	0,317
Necrose x Mastócitos a	-0,166	0,193
Necrose x Mastócitos b	-0,013	0,920

(*) $p < 0,05$

De acordo com os resultados, foi encontrada correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as porcentagens de necrose e os valores de VEGF a.

Isto indica que, à medida que os valores de uma das variáveis aumentam os da outra diminuem; à medida que os valores de uma das variáveis diminuem os da outra aumentam.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O questionamento principal para realização do presente estudo foi devido à maioria das complicações do TRAM estarem relacionadas à inadequada perfusão vascular, o que pode levar à isquemia e conseqüentemente a necrose tecidual (HALLOCK, 2001; KIM *et al.*, 2007). Por ser um retalho pediculado no músculo reto do abdome direito, sua irrigação depende da artéria epigástrica caudal direita, o que o torna um retalho susceptível a necrose da região contralateral ao pedículo (DUNN, HUFF, MANCOLL, 1993).

Uma das formas de se estudar a viabilidade de tecidos e aumento da perfusão vascular é por meio dos modelos de retalhos cutâneos ou musculofasciocutâneo, e um dos recursos utilizados para melhorar essa perfusão é a terapia a *laser* de baixa intensidade que foi estudada, pioneiramente, em retalhos cutâneos por KAMI *et al.*, 1985 que encontraram resultados significantes em relação ao aumento da viabilidade do retalho.

Outros estudos foram realizados, porém sem padronização e seqüência de técnicas como SMITH *et al.* (1992); KUBOTA & OSHIRO (1996); AMIR *et al.* (2000) que mostraram resultados importantes, mas sem realizar comparações entre os estudos, devido à divergência de técnicas de aplicação e parâmetros do *laser* como densidade de energia, potência e energia total. Somente SMITH *et al.* (1992) não mostraram resultados significantes em relação a diminuição de necrose com a técnica de varredura.

Com o intuito de estudar os locais de irradiação PINFILDI *et al.* (2005) realizaram um estudo onde observaram que a aplicação dentro e ao redor do retalho cutâneo com *laser* de 632,8nm (He-Ne) obteve 21% de área de

necrose comparado a 48% do grupo controle o que levou um aumento da viabilidade do mesmo. PRADO *et al.* (2005) também estudaram a técnica de aplicação com somente 1 ponto na base cranial do retalho cutâneo, porém com *laser* com comprimento de onda de 830nm (AsGaAl) e encontraram resultados também significantes em relação a diminuição da necrose tecidual.

Na tentativa de comparar os tipos de *laser*, ASSIS *et al.* (2005) utilizaram 2 comprimentos de onda, um de 670nm (InGaAlP) e outro de 904nm (AsGa), sendo um vermelho visível e o outro infravermelho, respectivamente. Esses autores observaram que a aplicação com apenas um ponto na base cranial do retalho com o *laser* 670nm foi melhor do que o *laser* 904nm chegando a 27% de necrose e 37% respectivamente. Uma das hipóteses relatadas pelos autores foi que o aumento da viabilidade pode estar relacionado a estimulação dos vasos sanguíneos da região cranial do retalho randômico que não sofrem seccionamento no momento do ato operatório, facilitando assim o aumento da perfusão.

Esses achados não correspondem com os resultados de PRADO *et al.* 2005 quando se refere ao *laser* infravermelho, já que no estudo de ASSIS *et al.* 2005 o comprimento de onda do *laser* utilizado foi de 904nm (AsGa). Já no estudo de PRADO *et al.* 2005 o *laser* estudado foi com comprimento de onda de 830nm (AsGaAl) que encontrou área de necrose de 23,14% mostrando que o *laser* de 830nm pode ser mais eficaz na diminuição da área de necrose do que o de 904nm.

Não há na literatura pesquisada estudos com TRAM e terapia a *laser* de baixa intensidade associados. Há somente um estudo realizado por KUBOTA (2002) com outro modelo de retalho axial pediculado na artéria ílio-lombar com dimensões de 9X3 cm.

No presente estudo, o TRAM com base na artéria epigástrica caudal direita foi embasado no estudo de DUNN, HUFF, MANCOLL (1993) que

relataram que seria um modelo adequado para estudar a fisiologia de retalhos musculofasciocutâneos, o que corrobora com os estudos encontrados por ELY & FERREIRA, (2003), GARCIA *et al.* (2004) que também estudaram o fator necrose em TRAM.

A técnica operatória utilizada foi baseada nos estudos de ELY & FERREIRA (2003) que descreveram detalhadamente essa técnica. Durante o presente estudo, observou-se que a curva de aprendizagem do pesquisador para realização do TRAM foi fundamental para evitar viés de métodos, sendo este um retalho mais complexo do que o cutâneo de MCFARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965) que foi realizado por alguns trabalhos associados à terapia a *laser* de baixa intensidade.

A utilização de animais (ratos Wistar) para esse tipo de pesquisa facilita a busca por resultados a nível celulares mais detalhados sobre as alterações teciduais, podendo auxiliar na tentativa de esclarecer os mecanismos de ação que podem levar o tecido a aumentar a perfusão vascular, para posteriormente ser aplicado em seres humanos. Também o processo de manipulação laboratorial e facilidade de obtenção facilitam o desenvolvimento do estudo.

Diversos estudos nessa mesma área foram realizados com animais e pela necessidade de retirar amostras teciduais que são fundamentais para ao avanço das pesquisas. Esse fato tem dificultado a aprovação ética em humanos, que é fundamental para realização do mesmo. (SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA & OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005). Estudos em áreas de pesquisas clínicas são importantes como a ritidoplastia que há uma retirada de tecido cutâneo, podendo ser utilizado a terapia a laser de baixa intensidade pré-operatório permitindo uma avaliação mais aprofundada dos efeitos do *laser* sobre o tecido.

Após um estudo realizado por KUBOTA (2002) onde encontraram aumento do fluxo sanguíneo após avaliação com espectro de fluxometria e a utilização do *laser* 830nm (AsGaAl) com apenas um ponto sobre o pedículo de um retalho axial baseado na artéria íleo lombar esquerda, pode-se observar a falta de estudos relacionados a retalhos axiais com terapia a *laser* de baixa intensidade.

Devido a esse fato e também por utilizar um *laser* infravermelho, sendo observado na literatura que os *laser* visíveis como 670nm (InGaAlP) trazem melhores resultados, o presente estudo utilizou o retalho TRAM, que é descrito na literatura como um dos principais retalhos musculofasciocutâneos utilizados na prática clínica em comparação com um retalho axial baseado na artéria íleo lombar (HALLOCK, 2001; LIN, 2001; ELY & FERREIRA, 2003; GARCIA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007).

Locais de Aplicação e densidade de energias do *laser*

O objetivo de estudar qual técnica de aplicação e qual densidade de energia seria mais eficaz na diminuição da área de necrose surgiu, após estudos em retalhos cutâneos e axiais que demonstraram que ambas as técnicas trazem resultados importantes como nos estudos de KAMI *et al.* (1985) que aplicaram 18 pontos de radiação *laser* e PINFILDI *et al.* (2005) que aplicaram 27 e 54 pontos de *laser* ao redor do retalho, dentro e ao redor do mesmo, respectivamente.

PRADO *et al.* (2005) aplicaram 1 ponto de radiação laser na base cranial de um retalho randômico e KUBOTA (2002) aplicou 1 ponto sobre o pedículo de um retalho axial, também observando em ambos estudos resultados significantes em relação ao aumento de perfusão vascular e viabilidade dos retalhos.

A utilização da terapia a *laser* de baixa intensidade em TRAM é pioneiro na literatura pesquisada. O presente estudo foi composto por 7 grupos experimentais sendo o Grupo 1 controle que obteve uma média de necrose

de 37.49%, que corrobora com os estudos de SANO *et al.* (2001) que encontraram 36% de necrose nos animais que foram submetidos ao TRAM.

As distribuições dos pontos utilizadas no presente estudo foram com 1 ponto de aplicação sobre o pedículo como observado no estudo de KUBOTA (2002), mais precisamente sobre a artéria epigástrica caudal direita e também com 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do TRAM como observado no estudo de PINFILDI *et al.* (2005); porém com quantidade de pontos diferentes, devido as dimensões dos retalhos, onde o retalho cutâneo randômico realizado por PINFILDI *et al.* (2005) possuía as dimensões de 10X4cm e o retalho TRAM possuía as dimensões de 5X3cm.

Essas distribuições de pontos foram empregadas com o objetivo de avaliar se realmente a estimulação apenas da artéria epigástrica caudal direita do TRAM (grupos 2, 4 e 5) seria o suficiente para obter um aumento da viabilidade do mesmo. Ou se a aplicação de 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho (grupos 3, 6 e 7) seria suficiente para estimular angiogênese no retalho e em sua periferia, levando assim a um aumento da viabilidade do TRAM.

Outro fator determinante para a aplicação foi a densidade de energia utilizada para o estudo. A literatura diverge em relação a esse parâmetro, relatando em estudos densidade de energias que vão desde 0,082J/cm² (SMITH *et al.*, 1992) a 185J/cm² (KUBOTA, 2002), dificultando a convergência entre as energias depositadas no tecido. Pode-se observar no presente estudo que as densidade de energias utilizadas foram de 3, 6, 72 e 144J/cm² devido a distribuição e também a concentração de energia em pontos.

Um fator que contribui para convergência e entendimento da quantidade de energia empregada ao tecido é o parâmetro energia total (E) que atualmente é discutida e analisada nos estudos com terapia a *laser* de baixa intensidade. Quando se discute energia total ou energia, deve-se pensar que

$E=P$ (potência de saída W) X Tempo de aplicação (densidade de energia), o que determina toda a irradiância entregue ao tecido. No presente estudo as energias utilizadas foram 0,18; 4,32; 0,36 e 8,64J o que mostra valores menores quando comparado as densidade de energias ou densidade de energia (J/cm^2). Esse fator é relevante para o entendimento de densidade de energias elevadas, como no estudo de KUBOTA (2002) que utilizou uma densidade de energia de $185J/cm^2$; porém com energia total de 1J o que difere do presente estudo que chegou a utilizar densidade de energia de $144J/cm^2$ com energia total de 8,64J concentrada somente em um ponto de aplicação. Outros estudos como AMIR *et al.* (2002) que utilizaram energia de 1,8J e 3,6J encontraram resultados significantes, porém em outro tipo de retalho cutâneo.

A energia total (E) atualmente é um parâmetro muito discutido na literatura, já que as potências utilizadas nos *laser* estão relacionadas à energia total e esses parâmetros não são padronizados para cada equipamento. A energia total facilita o cálculo para o conhecimento da quantidade de energia entre aos tecidos nos estudos encontrados na literatura, já que a maioria dos estudos não traz todos os dados necessários para calcular a densidade de energia e outros parâmetros relacionados ao tratamento.

No presente estudo as mesmas energias (E) foram aplicadas ao tecido de formas diferentes, ou seja, em apenas 1 ponto e distribuídos em 24 pontos sobre e ao redor do TRAM o que demonstra o intuito de avaliar se realmente a distribuição da energia seria melhor do que o acúmulo em um só ponto.

A periodicidade de tratamento foi de 3 dias consecutivos, sendo após o ato operatório e nos outros 2 dias subseqüentes para realizar a avaliação no 4º dia pós-operatório. Essa freqüência de tratamento diferencia dos demais trabalhos com retalhos cutâneos randômicos que utilizam a terapia a *laser*

de baixa intensidade por 5 dias consecutivos e avaliaram no 7º dia, porém em retalhos cutâneos randômicos diferentemente do presente estudo que avaliou necrose em TRAM.

HARDER *et al.* (2004) descreveram em um estudo sobre a evolução do tecido isquêmico que no 7º dia pós-operatório em ratos não se observa mais sinais de neovascularização quando não utiliza nenhum tipo de terapia. O presente estudo avaliou os animais no 4º dia pós-operatório com o intuito de avaliar a necrose tecidual que já se apresentava demarcada e também com o intuito de retirar amostras de tecido para avaliar mastócitos, VEGF e vasos sanguíneos.

Devido à realização de um estudo piloto, foi observado que a necrose do TRAM já estava totalmente demarcada no 4º dia PO. As amostras para quantificar mastócitos, VEGF e vasos sanguíneos foram retiradas e avaliadas atingindo valores significantes até o 4º dia PO. A avaliação das amostras do piloto no 7º dia não mostrou valores significantes, deixando uma dúvida se o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade não teria ocorrido na fase aguda e sub-aguda do ato operatório, ocasionando assim perspectivas para realização de estudos futuros a respeito do efeito imediato e tardio do *laser*.

Foi observado que no 7º dia poderia ser um período muito distante para avaliar a degranulação dos mastócitos que apresentou de forma mais acentuada na fase aguda (SAWASAKI *et al.*, 2007; VASHEGHANI *et al.*, 2008) ocorrendo assim uma quantificação celular mais precisa de acordo com a utilização da terapia a *laser* de baixa intensidade.

Avaliação macroscópica da necrose tecidual

Na literatura são encontrados alguns trabalhos demonstrando a eficácia do *laser* na viabilidade dos retalhos cutâneos que corroboram os resultados do presente estudo (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA & OHSHIRO, 1996;

KUBOTA, 2002; PRADO *et al.*, 2005), entretanto, nota-se uma ampla discrepância na padronização dos parâmetros de aplicação da laserterapia, dificultando a comparação de resultados e também a interpretação de alguns mecanismos de ação desse recurso terapêutico.

Pode-se observar em relação à necrose tecidual que tanto a distribuição de pontos quanto o acúmulo de energia em um só ponto sobre o pedículo não tiveram diferenças significantes entre si, mas em relação ao grupo controle, todos os grupos obtiveram valores significantes. Porém, o grupo 2 que foi submetido a terapia a *laser* de baixa intensidade com apenas 1 ponto sobre o pedículo com uma densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e com energia de 0,18J obteve um valor de 22,95% de necrose, o que o diferenciou estatisticamente dos grupos 3, 4, 5, 6 e 7 que obtiveram valores de 9,55%, 8,28%, 9,71%, 8,57% e 8,42% respectivamente. Um fator determinante para esses valores está relacionado a energia depositada ao tecido, já que 0,18J em apenas um ponto é considerada uma energia baixa comparada com o grupo 3 que recebeu 0,18J em cada ponto (24 pontos), totalizando 4,32J total de energia.

Os grupos 3, 4, 5, 6, 7 não tiveram diferenças significantes entre si na avaliação por meio do gabarito de papel, mostrando que a menor média de necrose encontrada foi de 8,28% referente ao Grupo 4 que foi submetido a radiação *laser* com um ponto sobre o pedículo com $72\text{J}/\text{cm}^2$ e 4,32J de energia total.

A não diferença entre os grupos 3-7 é importante na tentativa de mostrar que em um TRAM não há a necessidade de estimular todo o perímetro do retalho e que a estimulação apenas da artéria responsável pela irrigação do mesmo é o suficiente para que haja uma melhora na perfusão vascular. Esse resultado corrobora com os achados de KUBOTA (2002) que também irradiou um retalho dorsal apenas na artéria íleo lombar com apenas um

ponto, mostrando que há um aumento do fluxo sanguíneo com a estimulação *laser*.

O método de avaliação macroscópica por meio do gabarito de papel foi descrito por SASAKI & PANG (1980), para avaliar a necrose tecidual de retalhos cutâneos randômicos. A vantagem desse método está na facilidade de utilização e custo, devido a vasta utilização na literatura mostrando ser um método eficaz e confiável (SASAKI & PANG, 1980; LIEBANO *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005).

Esse método para avaliação em TRAM foi utilizado por SANO *et al.* (2001), que mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre o método gabarito de papel e por meio de computador, do qual foi escaneado eletronicamente e salvo em bitmap (.bmp) utilizando o programa Adobe Photoshop 6.0 mantendo a escala original.

A utilização de um método computadorizado evita alguns pequenos erros no momento da demarcação dos limites do retalho; porém esses autores discutem que mesmo esses pequenos erros não fazem diferença no momento da aferição, tornando assim o método gabarito de papel mais efetivo devido ao baixo custo, fácil manuseio e rapidez para avaliar (SANO *et al.* 2001).

No presente estudo foi necessário retirar amostras teciduais para realizar as análises histológicas para a avaliação de morfometria de mastócitos, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e vasos sanguíneos. Como não há na literatura respaldo literário a respeito do local para retirar amostras do TRAM associado a terapia a *laser* de baixa intensidade, foi observado em um estudo realizado por ELY *et al.* (2004) que retiraram três amostras, uma sobre o pedículo, outra da região distal e a outra extra-retalho (tecido viável) e outro estudo em TRAM realizado por LINEAWEAVER *et al.* (2004) que retiraram amostras da zona I e IV para realização de avaliação de expressão gênica e histológica.

No presente estudo foi retirado apenas 2 amostras nomeadas da seguinte forma: Amostra A foi retirada do lado ipsilateral ao pedículo (lado direito) do retalho, em sua porção sobre o pedículo 1cm acima da margem caudal do mesmo. Amostra B foi extra-retalho, do qual foi retirada a 2cm da margem caudal esquerda do mesmo e a 1cm da margem lateral esquerda do TRAM. Foi realizado um estudo piloto para saber se realmente seria necessário a terceira amostra (região distal) como no estudo realizado por ELY *et al.* (2004) que não utilizaram as amostras para avaliação histológica e sim para avaliar MDA (Malondialdeído).

No estudo piloto foi observado com a avaliação histológica que a amostra da região de possível necrose não poderia ser retirada para a análise devido ao fato do tecido necrótico não fornecer condições favoráveis de avaliação morfométrica e nem para fixação de reagentes para imunohistoquímica.

Avaliação histológica dos mastócitos

Para a realização da análise de mastócitos, foi utilizada a coloração de Azul de Toloidina, específica para demarcação de mastócitos que os deixam com a coloração azul escuro e de fácil visualização para morfometria (EL SAYED & DYSON, 1996).

Não há na literatura pesquisada estudos que avaliam a quantidade de mastócitos encontrados em retalhos cutâneos e TRAM, porém, há estudos que demonstram a importância da degranulação dos mesmos para a estimulação da circulação (EL SAYED & DYSON, 1996; VASHEGHANI *et al.*, 2008).

Os mastócitos são sensíveis a IgE específico e quando entram em contato, estimulam a liberação de mediadores químicos situados em vesículas dentro dos mastócitos (degranulação) como a serotonina, heparina e histamina. Tanto a serotonina quanto a histamina possuem

propriedades vaso-ativas que são muito importantes para a melhora da perfusão vascular (LINDSTEDT & KOVANEN, 2006).

Um dos mecanismos avaliados no presente estudo a respeito do aumento do fluxo sanguíneo é a exocitose dos mastócitos, que por sua vez favorece a liberação de histamina, o que facilita a vasodilatação (SAWASAKI *et al.*, 2007).

Pode-se observar aumento no número de mastócitos nos grupos irradiados com densidade de energias de 6 e 144J/cm², porém, a técnica aplicada entre esses grupos foi diferente. O grupo 5 foi irradiado com apenas um ponto sobre o pedículo com energia total de 0,36J (6J/cm²) mostrando uma média de aumento de 1,7. O grupo 6 foi irradiado com 24 pontos dentro e fora do TRAM com uma energia total de 8,64J (6J/cm²) mostrando uma média de aumento de 1,4, diferente do grupo 7 que foi irradiado da mesma forma que o grupo 5 com apenas um ponto e apresentou uma média de aumento de 1,7, porém com uma energia total de 8,64J (144J/cm²).

O aumento na quantidade de mastócitos do presente estudo vão de encontro com os achados de EL SAYED & DYSON (1996) que estudaram o aumento dos mastócitos e a degranulação dos mesmos com radiação *laser* em feridas de pele (úlceras) de ratos. Apesar de utilizar um *laser* infravermelho de 820nm, os autores encontraram um aumento significativo de mastócitos comparado ao grupo controle.

VASHEGHANI *et al.* (2008) estudaram também o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade com um *laser* vermelho visível no aumento de mastócitos e na degranulação. O *laser* utilizado possuía um comprimento de onda de 632,8nm (He-Ne) e no presente estudo foi utilizado um *laser* diodo de 670nm (InGaAlP).

Os resultados encontrados por VASHEGHANI *et al.* (2008) foram em ratos submetidos a queimadura de segundo grau, encontrando um aumento

significante de mastócitos e principalmente na degranulação dos mesmos nos animais submetidos a terapia a *laser* com densidade de energia de $2.4\text{J}/\text{cm}^2$. Quando se compara as densidade de energias pode-se observar que as densidade de energias do presente estudo de $3\text{J}/\text{cm}^2$ com apenas um ponto ou com 24 pontos de aplicação não demonstrou aumento significativo quando comparado aos grupos com densidade de energias mais elevadas de $6\text{J}/\text{cm}^2$.

Pelos resultados encontrados pode-se notar que os mastócitos são dependentes das densidade de energias, o que se pode chamar de dose-dependente. As densidade de energias mais elevadas e com apenas 1 ponto de aplicação sobre o pedículo de 6 e $144\text{J}/\text{cm}^2$ mostraram ser melhores do que os outros grupos experimentais.

O aumento no número de mastócitos com *laser* de comprimento de onda de 670nm também corroboram com os achados de SAWASAKI *et al.* (2007) que estudaram a terapia a *laser* de baixa intensidade com o mesmo tipo de *laser* e densidade de energia de $8\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de 12J em mucosa oral em humanos. De acordo com os resultados do presente estudo e com SAWASAKI *et al.*, 2007 os mastócitos se mostraram sensíveis a energia elevada como foi encontrado com energia de 8,64J no grupo 7.

As amostras B (tecido viável) que não foram submetidas a radiação *laser*, apresentaram um aumento no número de mastócitos com média de 1,3 e 1,4 para o grupo 3 e 5 respectivamente, tendo resultados significantes em relação ao controle das amostras B. O grupo 2 mostrou um número menor de mastócitos de 0,9 e 0,8 tanto para amostra A quanto para B em relação a todos os grupos, porém, sem resultados significantes em comparação ao grupo controle, mas mostrou diferenças estatisticamente significativa para os grupos 3, 5 e 7.

Não foi encontrado na literatura resposta fisiológicas para esse achado de diminuição de mastócitos para o grupo 2, que foi irradiado com densidade

de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (0,18J) em apenas 1 ponto. Em relação à necrose tecidual o grupo 2 foi o que apresentou maior porcentagem de necrose com 22,95% quando comparado aos outros grupos experimentais.

Uma possível hipótese pode estar relacionada à baixa energia aplicada ao tecido, uma vez que os grupos que apresentaram um aumento significativo de mastócitos foram irradiados com energia que alcançou $144\text{J}/\text{cm}^2$ (8,64J). Esse fato aumenta a perspectiva para estudos que possam avaliar a sensibilidade dos mastócitos em relação as diferentes densidades de energias de irradiação *laser*. Estudos com períodos de avaliações e com densidade de energias que demonstraram ser mais significantes para o aumento do número de mastócitos, seriam importantes para tentar nortear o caminho relacionado a período de avaliação pós-lesão e densidade de energias mais importantes.

Imuno-histoquímica para vasos sanguíneos (1A4)

No presente estudo, o marcador 1A4 (actina alfa de músculo liso) foi utilizado após estudo piloto com marcadores CD31, CD34 e Fator VIII, que não foram específicos para marcação de vasos sanguíneos, devido a não especificidade para tecidos de ratos, dificultando a análise morfométrica demonstrando ser insatisfatória para tal avaliação. O único marcador positivo foi a actina alfa de músculo liso, que, embora não tão específico para vasos, corou a paredes vasculares. Esses mesmos resultados foram encontrados no estudo de MATAYOSHI *et al.* (2003) que avaliaram vasos sanguíneos e não encontraram resultados com os marcadores CD31, CD34 e Fator VIII, mostrando também que o marcador 1A4 foi mais específico para essa avaliação.

PINHEIRO *et al.* (2005) também avaliaram vasos sanguíneos em úlceras submetidas à terapia a *laser* de baixa intensidade utilizando o marcador

1A4 mostrando ser um marcador eficiente para imuno-histoquímica de vasos sanguíneos.

No presente estudo pode-se observar que todos os grupos experimentais apresentaram melhores resultados do que o grupo controle, mostrando um aumento significativo no número de vasos sanguíneos. Os grupos com maiores médias foram os grupos 3 e 7 com 3,5 e 4 respectivamente. Nos estudos relacionados a retalhos pode-se notar que a diminuição da área de necrose está relacionada diretamente ao aumento do fluxo sanguíneo como no estudo de KUBOTA (2002) que avaliou o por meio do *laser* Doppler demonstrando um aumento significativo no fluxo no 5º e 10º minutos pós-radiação nos grupos experimentais comparado com o grupo controle. No 5º dia pós-radiação, houve diferença significativa na área de viabilidade dos retalhos de todos os grupos comparado com o grupo controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos irradiados.

Um fator que chamou a atenção foi o aumento no número de vasos para a amostra B (extra retalho) que não foi submetido a radiação *laser*, apresentando resultados menores do que a amostra A, porém com valores estatisticamente significante para o grupo 7 (densidade de energia de $144\text{J}/\text{cm}^2$ e energia de 8,64J) que apresentou média de 2,5 comparado aos demais grupos com médias entre 1,3 a 2,2. Pode-se notar que o aumento da amostra B acompanhou o da amostra A.

Não há na literatura pesquisada estudos que investigaram o efeito sistêmico do *laser*, deixando assim uma lacuna para hipóteses desse possível aumento em relação ao número de vasos e uma perspectiva importante para o esclarecimento de possíveis mecanismos. Estudos bem controlados metodologicamente a respeito de efeitos sistêmicos com controle do próprio animal seriam interessantes para tentar elucidar esses mecanismos com densidade de energias que mostraram obter esse tipo de efeito como $144\text{J}/\text{cm}^2$ ou 8,64J.

A amostra B do grupo controle apresentou uma diminuição no número de vasos comparado ao grupo controle da amostra A, mostrando que os grupos irradiados com *laser* tiveram realmente efeitos sistêmicos relacionados às diferentes densidade de energias utilizadas.

Existem relatos na literatura de que o *laser* de baixa intensidade tem a capacidade de aumentar o fluxo sangüíneo na microcirculação por aumentar a liberação de óxido nítrico no local irradiado, sendo este um potente vasodilatador (BAXTER, 1991; WILDEN & KARTHEIN, 1998; KITCHEN & BAZIN, 1996; FILLIPIN *et al.*, 2005). Além disso, pode promover a liberação e secreção de fatores de crescimento relacionados com a angiogênese (KIPSHIDZE *et al.*, 2001), possibilitando, dessa forma, o fornecimento de oxigênio e nutrientes mais adequado para atender às necessidades da fase proliferativa do processo de reparo tecidual (KITCHEN & BAZIN 1996; SCHINDL *et al.*, 1999).

Observou-se também que à medida que os retalhos TRAMs foram submetidos às irradiações com as densidade de energias maiores houve uma diminuição da média das áreas de necrose e um aumento no número de vasos desses retalhos, obtendo-se assim maior eficácia no tratamento proposto, como se pode observar nos grupos experimentais, com exceção do grupo 2 que foi submetido a radiação *laser* com densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ em apenas um ponto sobre o pedículo, obtendo uma média de área de necrose de 22,95% e com número de vasos menores do que o grupo controle com médias de 2,9 e 1,8 respectivamente, tanto para a amostra A quanto para a B.

Na avaliação de mastócitos o grupo 2 também apresentou valores inferiores ao grupo controle e aos demais grupos com média de 0,9. O fato do grupo 2 apresentar a maior média de área de necrose em relação aos grupos experimentais (3,4,5,6,7) e os menores valores de mastócitos e vasos sanguíneos também comparado ao grupo controle levam a hipótese

de que, o aumento da perfusão vascular está correlacionado ao aumento de vasos sanguíneos e mastócitos presentes no tecido. Esses dois fatores se mostraram aumentados nos demais grupo experimentais.

Um possível mecanismo para essa diminuição de necrose do grupo 2 com 22,95% que se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,000$) em relação ao grupo controle com média de 37,49% foi o aumento no número de VEGF, que teve uma média maior do que o grupo controle com valores de 2,2 para 1,2 do grupo controle, mostrando valores estatisticamente significativa ($p < 0,012$) somente para a amostra A. Isso deve pelo fato do grupo 2 nas avaliações de mastócitos e vasos sanguíneos apresentar valores menores do que o grupo controle. A densidade de energia aplicada no grupo 2 foi de $3\text{J}/\text{cm}^2$ com apenas um ponto sobre o pedículo aplicando assim apenas 0,18J, o que possivelmente não foi suficiente para estimular a proliferação de mastócitos e vasos sanguíneos, deixando assim uma lacuna para estudos futuros relacionados a densidade de energias com apenas 1 ponto de aplicação em TRAM tanto para lasers visíveis quanto para infravermelhos.

Os resultados dos trabalhos analisados na literatura e também do presente estudo, não demonstraram um efeito inibitório do *laser* nas densidade de energias utilizadas, porém, neste estudo observou-se a existência de um efeito dose-dependente, de acordo com o proposto pela Lei de Arndt-Schultz. Essa lei prediz que as células alteram suas atividades biológicas em função da quantidade de estímulo aplicado, ou seja, na medida em que se utilizaram densidade de energias maiores houve um aumento na viabilidade dos retalhos cutâneos.

É importante analisar que os grupos 3, 6 e 7 apresentaram um maior número de vasos, ressaltando que o grupo 3 foi submetido a radiação com energia total de 4,32J distribuídos dentro e ao redor do TRAM e o grupo 6 com energia total 8,64J e distribuídos igualmente ao grupo 3. O grupo 7

que foi submetido a terapia a *laser* em um único ponto sobre o pedículo mostrou melhores resultados do que os dois grupos que distribuíram a energia, sendo que foi aplicado ao tecido 8,64J em um único ponto, podendo dessa forma causar um efeito inibitório, o que não foi encontrado.

A utilização de um outro comprimento de onda na faixa de 830nm para a mesma técnica com apenas 1 ponto e densidade de energias altas é importante para estudar o efeito inibitório, como no estudo de KUBOTA (2002), que também observou uma alta energia com 185J/cm² não encontrando efeito inibitório e sim, efeitos que estimularam o fluxo sanguíneo.

Imuno-histoquímica para Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

A terceira avaliação histológica do presente estudo foi a morfometria por imuno-histoquímica com VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

A angiogênese é essencial para o processo de desenvolvimento do sistema de crescimento vascular e um dos eventos mais precoce na organogênese. Isso faz com que se torne indispensável para o processo de reparo tecidual e para restaurar o fluxo sanguíneo de lesões teciduais (ZHANG *et al.*, 2001; COULTAS, CHAWENGSAKSOPHAK, ROSSANT, 2005). Devido a esse fato foi escolhido avaliar VEGF que é o principal agente angiogênico juntamente com os fibroblastos e o mais estudado na literatura (CARMELIET, 2005) e por não haver nenhum estudo em TRAM com terapia a *laser* de baixa intensidade que avaliasse VEGF.

Alguns estudos experimentais indicam que a administração exógena de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), que é um fator de crescimento relacionado à angiogênese e ao aumento da permeabilidade vascular (FLAMME *et al.*, 1995), pode promover a indução da angiogênese local e favorecer a viabilidade dos retalhos cutâneos (PADUBIDRI &

BROWNE, 1996; LI *et al.*, 2000). Também foi visto em um estudo de ZHANG *et al.*, 2001 que a administração de VEGF sub-dérmica de forma pré-operatória foi mais eficaz do que a administração via sistêmica e intra-arterial. Também foi observado que a administração intra-arterial não obteve resultados significantes em comparação ao grupo controle.

Foi observado no presente estudo que os grupos experimentais (2,3,4,5,6,7) quando comparado ao grupo controle mostraram aumentos estatisticamente significantes de VEGF, fato esse que corrobora com os achados de TUBY, MALTZ, ORON (2006) que estimularam com terapia a *laser* de baixa intensidade corações de animais submetidos a infarto do miocárdio, encontrando um aumento significativo de VEGF, determinando um processo de angiogênese importante.

As densidade de energias mais elevadas mostraram como na avaliação de mastócitos serem melhores para estimulação de VEGF principalmente para os grupos 5 e 7 (densidade de energias de $6\text{J}/\text{cm}^2$ e $144\text{J}/\text{cm}^2$) que mostraram aumentos com médias de 3,2 e 4,8 respectivamente.

Outro tópico relacionado a esses resultados é a técnica de aplicação do *laser*, sendo que os grupos 5 e 7 foram aplicados apenas 1 ponto sobre o pedículo indicando que o depósito de energia em apenas 1 ponto apresentou melhores resultados do que a distribuição de 24 pontos dentro e ao redor do TRAM, porém a distribuição dos pontos mostrou resultados significantes quando comparado ao grupo controle.

A técnica de aplicação e a quantidade de pontos da terapia a *laser* de baixa intensidade é um dos tópicos estudados na literatura em retalhos cutâneos, porém em TRAM não se encontrou estudos com esse objetivo. A divergência entre essas técnicas está relacionada ao acúmulo de energia ou a distribuição da mesma, já que as dimensões dos retalhos são importantes para a distribuição dos pontos, variando assim a quantidade de energia aplicada ao tecido.

Em retalhos cutâneos KAMI *et al.* (1985) irradiou 18 pontos dentro de um retalho cutâneo randômico e observaram resultados significantes em relação a diminuição da área de necrose. Já SMITH *et al.* (1992) não encontraram resultados significantes ao irradiar retalhos cutâneos em ratos e porcos, devido a técnica de aplicação muito discutida na literatura chamada de técnica de varredura, do qual o *laser* é aplicado sem estar em contato com a pele dificultando assim a penetração, absorção e irradiância do tecido.

Em todos os estudos encontrados na literatura sobre *laser* em retalhos, o estudo de SMITH *et al.* (1992) foi o único a utilizar essa técnica e também o único que não encontrou resultados positivos em relação à diminuição da área de necrose.

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

Com o mesmo intuito em um estudo realizado por PINFILDI *et al.* (2005), foi utilizado 27 e 54 pontos de radiação *laser* dentro do retalho, dentro e ao redor do retalho, respectivamente, com o intuito de avaliar a necrose tecidual para observar se a estimulação de todo o tecido do retalho seria melhor do que somente a estimulação da porção cranial como realizado nos demais estudos citados. Foi observado 22,61% de área de necrose quando irradiado com 54 pontos de *laser*. Esses resultados contradizem os estudos com apenas 1 ponto de aplicação já que também há

um estímulo a formação de novos vasos na periferia do retalho, podendo melhorar o aporte sanguíneo.

No presente estudo se pode observar que a terapia a *laser* de baixa intensidade quando utilizada em apenas um ponto sobre o pedículo, porém em TRAM (que predominantemente possui uma artéria responsável pelo aporte sanguíneo do retalho) aumentou a quantidade de VEGF nas amostras avaliadas e uma diminuição significativa da necrose tecidual, diferente dos estudos em retalhos cutâneos randômicos que não possui uma artéria responsável pelo aporte sanguíneo e sim vasos por toda periferia.

Na avaliação da amostra A para VEGF, onde foi irradiado *laser* no local exato do pedículo foi observado valores elevados de VEGF chegando a média de 4,8 para o grupo 7 que foi submetido a radiação com densidade de energia de $144\text{J}/\text{cm}^2$ em apenas 1 ponto. A amostra B também mostrou resultados significantes para os dois grupos 5 e 7 atingindo média de 2 e 3,1 respectivamente, deixando novamente uma lacuna para hipótese de encontrar aumento de VEGF em um tecido teoricamente distante do local da aplicação. Após os resultados encontrados, chamou-se atenção para estudos com amostras de regiões diferentes, como região dorsal, membros inferiores e superiores para realmente observar se há efeito sistêmico do *laser* e também observar se esse efeito é significativo para gerar resultados significantes.

Este fato é de suma importância para relevância clínica, já que os resultados mostram que a técnica de aplicação faz diferença entre os tipos de retalhos, devido ao fato de tempo de aplicação, quantidade de pontos e local da aplicação, sendo que somente a utilização do *laser* em apenas 1 ponto em TRAM é o suficiente para estimular um aporte sanguíneo melhor levando em consideração densidade de energias e tipo de *laser* utilizado.

Para avaliar se houve correlação entre as porcentagens de necrose e os valores de quantificação de mastócitos, VEGF e vasos sanguíneos (1A4),

foi realizado o Teste de Coeficiente de Correlação por Postos de Spearman para as duas amostras (A e B).

Pode-se observar que entre as correlações de necrose com todas as quantificações morfométricas houve uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre as porcentagens de necrose e os valores de VEGF das amostras A com valor de -0,323 e $p < 0,010$.

Isto indica que, à medida que os valores de uma das variáveis aumentam os da outra diminuem; à medida que os valores de uma das variáveis diminuem os da outra aumentam.

A avaliação de VEGF das amostras A de todos os grupos experimentais demonstrou valores estatisticamente significante em relação ao grupo controle demonstrando que todas as amostras A com avaliação de VEGF foram estatisticamente significante para correlação de spearman, porém, o grupo 7 que foi submetido a radiação *laser* com densidade de energia de $144\text{J}/\text{cm}^2$, energia total de 8,64J e com aplicação de 1 ponto sobre o pedículo obteve os maiores valores de VEGF com média de 4,8.

Numerosos estudos clínicos e experimentais têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a necrose tecidual em ambos os retalhos, tanto em TRAM com em retalhos cutâneos, porém, com terapia a *laser* de baixa intensidade em TRAM não foi encontrado nenhum estudo na literatura (OHSHIRO & FUJINO, 1993; KUBOTA & OHSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2002; ELY & FERREIRA, 2003; PRADO *et al.*, 2005; PINFILDI *et al.*, 2005). Os resultados desses estudos, entretanto, são primeiramente baseados na porcentagem da área de necrose. Para encontrar informações mais detalhadas sobre as causas da necrose desses retalhos, diversos estudos analisaram a microcirculação desses retalhos. Para isso, foram utilizadas diversas técnicas para melhorar o aporte sanguíneo como eletrodos polarográficos (ACHAUER, BLACK, LITKE, 1980) mensuração

do fluxo sanguíneo por fluxometria de *laser* Doppler (KUBOTA, 2002) e microesferas (KERRIGAN, 1983).

Entretanto, todas essas técnicas mensuram indicadores indiretos da perfusão vascular e não permitem avaliar o mecanismo hemodinâmico e celular pelo qual se pode minimizar ou prevenir a necrose tecidual.

O presente estudo pode contribuir para a literatura científica na tentativa de minimizar a necrose tecidual e mostrar o efeito da terapia a *laser* de baixa intensidade nas alterações dos mastócitos, vasos sanguíneos e VEGF, que são aspectos importantes e relacionados ao mecanismo do aumento de perfusão vascular.

Os resultados do presente estudo mostraram lacunas importantes como perspectivas no caso da necrose tecidual, podendo avaliar em estudos futuros óxido nítrico associado às alterações celulares com VEGF, cálcio intracelular relacionando apoptose celular e outros fatores de crescimento associados aos fibroblastos (WEBB, DYSON, LEWIS, 1998) que fazem parte da angiogênese e diminuição da necrose tecidual.

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

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A terapia a *laser* de baixa intensidade nas densidades de energias de 6 e 144J/cm² foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transversal do reto do abdome (*TRAM*) em ratos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Achauer BM, Black KS, Litke DK. Transcutaneous PO₂ in flaps: a new method of survival prediction. *Plast. Reconstr. Surg.* 1980;65(6):738.

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

Arnez ZM, Khan U, Pogorelec D, Planinsek F. Rational selection of flaps from the abdomen in breast reconstruction to reduce donor site morbidity. *Br J Plast Surg.* 1999;52:351-54.

Assis LR, Marcolino A, Pinfildi CE, Prado RP. Comparison of the 904 and 670 nm diode laser in viability of random skin flap in rats. 5th Congress of the World Association for Laser Therapy (WALT). *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):89-151.

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

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

Blondeel PN, Arnsteins M, Verstraete K. Venous congestion, blood flow in free transverse rectus abdominis myocutaneous, deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106:1295-99.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438(15):932-36.

Coultas L, Chawengsaksophak L, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 2005;438(15):937-45.

Clugston PA, Perry LC, Fisher J, Maxwell GP. A rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model: effects of pharmacological manipulation. *Ann Plast Surg.* 1995;34(2):154-61.

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

Dorion D, Boyd JB, Pang CY. Augmentation of transmidline skin perfusion and viability in transverse rectus abdominis myocutaneous (TRAM) flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg.* 1991;88:642-9.

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

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

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

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

Ely PB, Ferreira LM, Gomes HC, Campos JHO. Nicotina no retalho musculocutâneo transverso do músculo reto do abdome, em ratos [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.

Ferreira LM, Ferreira KLR. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras.* 2003;18:01-03.

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

Flamme I, Von Reutern M, Drexler HC, Syed-All S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol.* 1995;1(2):399-414.

Garcia EB, Ferreira LM, Sabino Neto M, Sallum N. Experimental model of cranially pedicled TRAM flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2004;19:59-64.

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

Hallock GG, Rice DC. Comparison of TRAM and DIEP flap physiology in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(5):1179-84.

Hallock GG. Physiological studies using laser doppler flowmetry to compare blood flow with zones of the free TRAM flap. *Ann Plast Surg.* 2001;47:229-33.

Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 1995;96:111-8.

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

Hartrampf CR, Schefflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69(2):216-24.

Ihsan MFR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomedicine Laser Surg.* 2005;23(3):289-94.

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

Junior IE, Masson IB, Ferreira LM, Liebano RE, Baldan C, Gomes AC. Topical administration of hydralazine hydrochloride on the viability of random skin flaps in rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(2):164-7.

Jurell G, Jonsson CE. Increased Survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1976;10:169.

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

Kami T. The experimental effect of low-energy laser on skin flap survival. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90:1127-8.

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

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

Kim EK, Lee TJ, Eom JS. Comparison of fat necrosis between zone II and zone III in pedicled transverse rectus abdominis musculocutaneous flaps: A prospective study of 400 consecutive cases. *Ann Plast Surg.* 2007;59:256-9.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Muckerheidi M, Keelan MH, Chekanov V, Maternowski M, Chawla P, Hernandez I, Iyer S, Dangas G, Sahota H, Leon MB,

Roubin G, Moses JW. Effect of short pulsed nonablative infrared laser irradiation on vascular cells in vitro and neointimal hyperplasia in a rabbit balloon injury model. *Circulation.* 2001;Oct9;104(15):1850-5.

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

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

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

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

Li QF, Reis ED, Zhang WX, Silver L, Fallon JT, Weinberg GH. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg.* 2000;16(1):45-9.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Can J Plast Surg.* 2002;10:151-4.

Lin KY, Patterson JW, Simons J, Long MD, Schultz RO, Amiss LR, Molloy JA, Kelly MD. Effects of external beam irradiation on the TRAM flap: An experimental model. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(5):1190-7.

Lindstedt KA, Kovanen PT. Isolation of mast cell granules. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006 Jan;Chapter 3:Unit 3.16.

Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular Endothelium Growth Factor, Surgical Delay, and Skin Flap Survival. *Ann Surg* 2004;239:866–75.

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

Matayoshi S, Santo RM, Capelozzi V, Saldiva PH, Alves MR. Proposição de modelo experimental para estudo morfométrico de vasos e células em esclera de coelhos. *Arq Bras Oftalmol*. 2003;66:437-41

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

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

Nahabedian MY, Momen B, Galdino G, Manson P. Breast reconstruction with the free TRAM or DIEP Flap: Patient selection, Choice of Flap, and Outcome. *Plast Reconstr Surg*. 2001;20:466-75.

Nahabedian MY, Dooley W, Singh N, Manson PN. Contour abnormalities of the abdomen after breast reconstruction with abdominal flaps: the role of muscle preservation. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109:91–101

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

Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Development of TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg*. 1994;94:1018-24.

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

Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades - parte 1. *Fisioterapia Brasil* 2001;2:221-40.

Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg.* 1996;37(6):604-11.

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

Pinheiro AL, Pozza DH, Oliveira MG, Weissmann R, Ramalho LM. Polarized light (400-2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. *Photomed Laser Surg.* 2005 Oct;23(5):485-92.

Prado RP; Ferreira LM, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE. Diode Laser in viability of random skin flap in rats. 5th Congress of the World Association for Laser Therapy (WALT). *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):89-151.

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

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

Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. *Lasers Med Sci.* 2007;Dec 15:[Epub ahead of print]

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

Schusterman MA, Page D, Sarian R. Autogenous tissue breast reconstruction. Pedicled or free TRAM flap? *Perspect Plast Surg.* 1999;13(2):1-15.

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

Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med.* 2006;38(7):682-8.

Tyner TR, Tong W, Donovan K, McDonald T, Sian K, Yamaguchi KT. Dichloroacetate Reduces Tissue Necrosis in a Rat Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap Model. *Ann Plast Surg.* 2006;56:320–26.

Vasheghani MM, Bayat M, Rezaei F, Bayat A, Karimipour M. Effect of Low-Level Laser Therapy on Mast Cells in Second-Degree Burns in Rats. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):1-5.

Veiga DF, Sabino Neto M, Garcia EB, Veiga Filho J, Juliano Y, Ferreira LM, Rocha JLBS. Evaluations of the aesthetic results and patient satisfaction with the late pedicled TRAM flap breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2002;48(5):515-20.

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

Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;Jun16(3):159-65.

Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KSJ, Barham CD, Waddell DL, Enwemeka CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(3):241-7.

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

Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, Buncke HJ, Lineaweaver WC. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat tram flap model. *Ann Plast Surg* 2001;46:314–19.

FONTES CONSULTADAS

10. FONTES CONSULTADAS

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

Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):23-33.

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

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

Graner EA. Estatística. Ed. Melhoramentos. São Paulo, 1966, 187 p.

Haddad N. Metodologia de estudos em ciências da saúde: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico. São Paulo: Roca; 2004.

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. *Acta Cir Bras*. 2005;20(supl.2):19-25.

Houaiss A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0 [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the Internet]. Vancouver (CA); update 2004 Oct [cited 2005 Nov 1]. Available from: <http://www.icmje.org/>

Michaelis A. Dicionário inglês-português. 25a ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997.

National Library of Medicine. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [text on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); c2003 [updated 2005 Sept 19; cited 2005 Nov 17]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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

Neter J, Kutner MH, Nachtschiem CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models, 4th ed. Boston: McGraw-Hill/Irwin, 1996.

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

Pérez D'Gregorio, R. Sistema Internacional de Unidades SI. Gac Med Caracas. 2002;110(4):541-64.

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Como elaborar uma tese [CD-ROM]. São Paulo: CEDCP; 2004.

Siegel S. Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento. Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975, 350 p.

Spector N. Manual para a redação de teses, dissertações e projetos de pesquisa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

ABSTRACT

Introduction: The LLLT has been used with the aim to improve the perfusion vascular of the skin and musculocutaneous flaps.

Objective: To assess the effect of low intensity laser therapy on the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap (*TRAM*) viability.

Methods: Were used 84 Wistar rats that random divided in 7 groups with 12 rats in each one. The Group 1 (sham laser), group 2 received 3J/cm² with 1 point, group 3 (3J/cm² 24 points), group 4 (72J/cm² 1point), group 5 (6J/cm² 1point), group 6 (6J/cm² 24 points) and group 7 (144J/cm² 1 point). All experimental groups were undergoing to LLLT immediately after the TRAM operation, and at the next two subsequent days, and so, animals underwent 3 days with applications. The percentage of skin flap necrosis area was calculated on the fourth postoperative day through the paper template method and 2 samples of skin were collected by a 1 cm² punch in order to perform mast cells evaluation, blood vessels with 1A4 and VEGF evaluations.

Results: Were found statistically significant differences among necrosis percentage, and higher values were seen in Group 1, over all other values. Among Groups 3 to 7 statistically significant differences were not found, with $p < 0.292$. To mast cells and VEGF evaluation the group 5 and 7 showed a significant increase when compared to another groups. The 1A4 evaluations showed that the groups 3 and 5 had a increase when compared to another groups.

Conclusion: Low level laser therapy on the fluences 6 and 144J/cm² was efficient to increase transverse rectus abdominis musculocutaneous flap (*TRAM*) viability in rats.

APÊNDICE I



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 25 de novembro de 2005.
CEP 1237/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) CARLOS EDUARDO PINFILDI

Co-Investigadores: Lydia Masako Ferreira (orientadora), Richard Eloin Liebano, Bernardo Hochman

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Laser de baixa intensidade 658 nm na viabilidade do retalhamento musculocutâneo transverso do músculo reto do abdome (TRAM), em ratos**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental - categoria C.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar o efeito da terapia a laser de baixa intensidade 685 nm na viabilidade do retalho musculocutâneo transverso do músculo reto do abdome (TRAM) em ratos.

RESUMO: Estudo com 60 ratos Wistar EPM-1. Anestésico: Zoletil 50 - Cloridr de tiletamina e Cloridrato de Zolazepan. Eutanásia: éter. Será utilizado um laser diodo de baixa intensidade visível, com comprimento de onda de 685 nm, potência de pico de 35 mW, óculos de proteção, área de feixe de 0,1 cm² com feixe contínuo e pulsado, porém será utilizada a forma de feixe contínuo. Os animais serão distribuídos em 5 grupos de 12 animais cada. Grupo 1- Controle placebo- simulação de aplicação da radiação laser; grupo 2 - radiação laser, imediatamente após a operação e nos outros 4 dias subsequentes, com técnica pontual com contato com 24 pontos dentro e fora do TRAM, com densidade de energia de 3J/cm²; grupo 3- será utilizada técnica pontual com contato com apenas 1 ponto sobre o pedículo do TRAM, com densidade de energia de 72 J/cm²; grupo 4- técnica pontual com contato-24 pontos dentro e fora do TRAM, com densidade de energia de 6J/cm²; grupo 5- técnica pontual com contato com apenas 1 ponto, e densidade de energia de 144 J/cm². No 7 dia pós operatório, os animais serão anestesiados e injetados com GFP por meia da veia peniana, para avaliação da porcentagem da área de necrose. Serão coletadas 3 amostras de pele para realização de avaliações de morfometria de vasos sanguíneos e contagem de células inflamatórias..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo visando avaliar a aplicação de laser de baixa intensidade na necrose ou viabilidade do retalhamento músculo cutâneo em ratos..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, com modelo experimental já utilizado anteriormente pelos pesquisadores.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo - R\$ 3255,00.

CRONOGRAMA: 5 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 20/11/2006 e 15/11/2007.

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

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

APÊNDICE II

Tabela 1 – Valores de F e das probabilidades a eles associadas, obtidas quando da aplicação da Análise de Variância às sete medidas de peso.

Variáveis Analisadas	Valores de F	Probabilidades
Peso dos animais	0,376	0,892

(*) $p < 0,05$

Tabela 2 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 1: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 1 (Controle)	
Avaliações	Médias
1A4 a	2.2
1A4 b	2.1
VEGF a	1.7
VEGF b	2.0
Mastócitos a	1.1
Mastócitos b	1.1

Tabela 3 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 2: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 2 ($3J/cm^2$ – 1 ponto)	
Avaliações	Médias
1A4 a	1.8
1A4 b	2.4
VEGF a	2.2
VEGF b	1.9
Mastócitos a	1.0
Mastócitos b	1.0

Tabela 4 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 3: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 3 (3J/cm ² – 24 pontos)	
Avaliações	Médias
1A4 a	3.2
1A4 b	2.5
VEGF a	2.7
VEGF b	1.8
Mastócitos a	1.5
Mastócitos b	1.6

Tabela 5 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 4: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 4 (72J/cm ² – 1 ponto)	
Avaliações	Médias
1A4 a	2.8
1A4 b	1.9
VEGF a	2.6
VEGF b	1.6
Mastócitos a	1.2
Mastócitos b	1.0

Tabela 6 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 5: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 5 (6J/cm ² – 1 ponto)	
Avaliações	Médias
1A4 a	2.6
1A4 b	2.5
VEGF a	3.0
VEGF b	2.2
Mastócitos a	1.8
Mastócitos b	1.5

Tabela 7 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 6: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 6 (6J/cm ² – 24 pontos)	
Avaliações	Médias
1A4 a	3.8
1A4 b	2.2
VEGF a	3.0
VEGF b	2.0
Mastócitos a	1.3
Mastócitos b	1.1

Tabela 8 – Valores relacionados às médias encontradas nas avaliações do grupo 7: 1A4 a, 1a4 b, VEGF a, VEGF b, Mastócitos a e Mastócitos b, considerando o segundo avaliador.

Segundo Avaliador – Grupo 7 (144J/cm ² – 1 ponto)	
Avaliações	Médias
1A4 a	3.7
1A4 b	2.8
VEGF a	4.7
VEGF b	2.8
Mastócitos a	1.9
Mastócitos b	1.1

Tabela 9 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às medias dos sete grupos, considerando-se os valores relativos ao segundo avaliador, no item 1A4 a.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
G1 x G2	0,154
G1 x G3	0,155
G1 x G4	0,565
G1 x G5	0,505
G1 x G6	0,033*
G1 x G7	0,051
G2 x G3	0,011*
G2 x G4	0,036*
G2 x G5	0,012*
G2 x G6	0,001*
G2 x G7	0,001*
G3 x G4	0,352
G3 x G5	0,248
G3 x G6	0,425
G3 x G7	0,535
G4 x G5	0,689
G4 x G6	0,052
G4 x G7	0,144
G5 x G6	0,009*
G5 x G7	0,033*
G6 x G7	0,657

(*) $p < 0,05$

Tabela 17 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às medias dos sete grupos, considerando-se os valores relativos ao segundo avaliador, no item VEGF a.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
G1 x G2	0,245
G1 x G3	0,023*
G1 x G4	0,023*
G1 x G5	0,014*
G1 x G6	0,009*
G1 x G7	0,000*
G2 x G3	0,300
G2 x G4	0,328
G2 x G5	0,000*
G2 x G6	0,248
G2 x G7	0,001*
G3 x G4	0,894
G3 x G5	0,506
G3 x G6	0,564
G3 x G7	0,008*
G4 x G5	0,330
G4 x G6	0,505
G4 x G7	0,002*
G5 x G6	0,723
G5 x G7	0,024*
G6 x G7	0,034

(*) $p < 0,05$

Tabela 18 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às medias dos sete grupos, considerando-se os valores relativos ao segundo avaliador, no item Mastócitos a.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
G1 x G2	0,505
G1 x G3	0,131
G1 x G4	0,789
G1 x G5	0,024*
G1 x G6	0,476
G1 x G7	0,023*
G2 x G3	0,101
G2 x G4	0,309
G2 x G5	0,013*
G2 x G6	0,232
G2 x G7	0,013*
G3 x G4	0,231
G3 x G5	0,308
G3 x G6	0,478
G3 x G7	0,330
G4 x G5	0,051
G4 x G6	0,425
G4 x G7	0,019*
G5 x G6	0,085
G5 x G7	0,929
G6 x G7	0,051

(*) $p < 0,05$

Tabela 19 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às medias dos sete grupos, considerando-se os valores relativos ao segundo avaliador, no item Mastócitos b.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
G1 x G2	0,690
G1 x G3	0,009*
G1 x G4	0,722
G1 x G5	0,017*
G1 x G6	0,564
G1 x G7	0,756
G2 x G3	0,051
G2 x G4	0,029*
G2 x G5	0,063
G2 x G6	0,506
G2 x G7	0,894
G3 x G4	0,008*
G3 x G5	0,505
G3 x G6	0,012*
G3 x G7	0,057
G4 x G5	0,014*
G4 x G6	0,212
G4 x G7	0,859
G5 x G6	0,045*
G5 x G7	0,069
G6 x G7	0,424

(*) $p < 0,05$

LIBERAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DAS FIGURAS DE ESQUEMAS DO MODELO TRAM

Prezado Carlos Eduardo Pinfildi,

Seria uma honra ter os desenhos e esquemas do modelo TRAM em rato, citados e utilizados em sua tese.

A permissão está concedida.

Acredito não haver necessidades de uma liberação mais ostensiva do que a própria citação da referência da Acta Cirúrgica.

Abraço,

Dr. Pedro Bins Ely.