PAULO SÉRGIO BOSSINI

***LASER* DE BAIXA INTENSIDADE (670nm) NA
VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO
RANDÔMICO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos) da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

**SÃO CARLOS – SP
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B745L Bossini, Paulo Sérgio
Laser de baixa intensidade (670nm) na viabilidade do
retalho cutâneo randômico em ratos / Paulo Sérgio Bossini
; orientador Nivaldo Antonio Parizotto. -- São Carlos,
2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia. Área de Concentração:
Interação de Agentes Físicos com Sistemas Biológicos) --
Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2007.

1. Retalhos cirúrgicos. 2. Terapia laser de baixa
intensidade. 3. Cicatrização. 4. Fluência. I. Título.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, sob orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto.

Os créditos referentes às disciplinas foram obtidos junto ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão / Instituto de Química de São Carlos) da Universidade de São Paulo e Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais: Luiz Paulo e Benta

As palavras tornam-se incapazes de registrar o amor que eu sinto por vocês... é algo singular!

Obrigado por tanto carinho, tanto companheirismo e por serem exemplos
de seres humanos tão grandiosos.

Vocês foram e sempre serão os maiores presentes que Deus me deu nesta vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Com todo carinho ao meu orientador: **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto**

Por abrir a porta de um grande sonho...

Obrigado por ter acreditado em meu trabalho, possibilitado meu crescimento profissional e, acima de tudo, pela amizade e companheirismo construídos durante esse período de convivência.

Seus ricos ensinamentos de pesquisa e de vida serão inesquecíveis!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado e amparado durante esta caminhada.

À minha querida irmã Cláudia, por estar sempre presente e pelas ótimas risadas...eu te amo!

A toda minha família, por sempre me apoiar e torcer pelas minhas conquistas.

Aos fisioterapeutas Carlos Eduardo Pinfildi, doutorando do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora da UNIFESP – EPM e Rodrigo Paschoal Prado, doutorando do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina da USP, pelas sugestões e trocas de idéias a respeito do trabalho. No decorrer desse período, construímos uma bela amizade e agora somos grandes parceiros. Muito obrigado pela atenção e carinho.

À banca do exame de qualificação, Prof^ª. Dr^ª. Luciana Almeida Lopes e Prof. Dr. Richard Eloin Liebano, por aceitarem participar e colaborar com o meu crescimento científico. Com certeza, vocês contribuíram para a maior objetividade, clareza e entendimento do estudo.

Ao Prof. Dr. Benedito Galvão Benze do Departamento de Estatística da UFSCar, pela grande contribuição na análise estatística dos resultados. Sua humildade em transferir seu conhecimento é algo emocionante. Admiro-lhe muito!

Ao Prof. Dr. Carlos Benatti Neto e ao técnico em histologia José Antônio Zuanon, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, por terem disponibilizado o laboratório e pela grande ajuda no processamento histológico. Obrigado também pelas sugestões, contribuindo desta forma para a melhor elaboração deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFSCar, Renan Fangel e Rafael Malfará Habenschus, pela amizade e dedicação com o nosso trabalho.

Ao amigo Marcos Arduin, professor da disciplina de microscopia do Departamento de Biologia da UFSCar, pelas importantes sugestões e dicas de microscopia.

À amiga Luciana Di Thommazo, pelas sugestões na revisão do texto.

Ao querido amigo Fábio Mendes Camilo, pelo incentivo, carinho e companheirismo durante esses anos de amizade.

À Ana Cláudia Muniz Rennó, que foi uma das primeiras pessoas que conheci assim que cheguei a São Carlos, pela acolhida no laboratório e confiança em mim depositada. Obrigado também pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Às amigas, Renata Neves Granito, Karina Gramani e Luciana Cofiel, pelo apoio e carinho durante esse período.

Aos amigos do Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar, Paulo Koeke, Wouber, Olga, Davilene, Charles e Livia, pelos momentos compartilhados.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da USP, Elton, Eugenia, Karen, Ana Rosa e Kaká, pelos finais de semana e feriados que passamos no departamento estudando... foi um período de grande aprendizado. Muito obrigado pela amizade.

Ao Raphael, meu amigo e companheiro de apartamento em São Carlos, pela amizade verdadeira e pelo auto-astral. Você é um grande irmão!

À querida amiga Fernanda Mendes, por ter sido minha parceira de laboratório durante dois anos. Obrigado pela sua companhia, equilíbrio e pelos papos descontraídos.

Ao grande amigo Marcelo Fácio Palin, pelos conselhos e incentivo dado durante esta caminhada.

Aos funcionários do Biotério Central da UFSCar, Roberto e Rivair, pela atenção e apoio sempre que precisei.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da USP, Janete e Bárbara, pela dedicação e eficiência.

Ao Prof. André, pelas excelentes aulas de inglês.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

*“Viver,
e não ter a vergonha de ser feliz,
cantar e cantar e cantar
a beleza de ser um eterno aprendiz....”*

(Gonzaguinha)

RESUMO

BOSSINI, P. S. *Laser de baixa intensidade (670nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos*. 2007. 132 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC, FMRP, IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Introdução: Os retalhos cutâneos são amplamente utilizados na cirurgia plástica, principalmente na reparadora. Após o procedimento operatório, uma das principais complicações é a isquemia, podendo ocasionar a necrose do retalho. Vários recursos têm sido estudados com o intuito de aumentar a viabilidade desses retalhos. Dentre esses recursos, o *laser* de baixa intensidade é uma alternativa de tratamento, uma vez que pode promover um aumento da microcirculação e da neoformação vascular. Entretanto, existem discrepâncias na literatura em relação aos parâmetros empregados no uso do *laser* de baixa intensidade, principalmente das fluências utilizadas nos tratamentos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de diferentes fluências do *laser* de 670nm, na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. **Metodologia:** Foram utilizados 100 ratos, da linhagem Wistar, distribuídos em 5 grupos de 20 animais cada. O retalho cutâneo randômico de base cranial foi realizado com dimensões de 10 X 4cm e uma barreira plástica foi interposta entre o mesmo e o leito doador. O grupo 1 (controle) foi submetido à simulação de tratamento com o aparelho desligado. O grupo 2 foi submetido à radiação *laser* com fluência de 3J/cm². Os grupos 3, 4 e 5 foram irradiados com fluências de 6J/cm², 12J/cm² e 24J/cm², respectivamente. Todos os grupos experimentais receberam a radiação *laser* imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subsequentes, utilizando-se a técnica pontual em contato em 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho. No sétimo dia pós-operatório, as porcentagens da área de necrose dos retalhos foram avaliadas pelo método do gabarito de papel e também foi coletada uma amostra do retalho de 10 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, para a realização da contagem dos vasos sanguíneos. **Resultados:** O grupo 1 apresentou média de área de necrose de 49,92%; o grupo 2 – 41,84%; o grupo 3 – 36,51%; o grupo 4 – 29,45% e o grupo 5 – 20,37%. Na contagem dos vasos, o grupo 1 obteve média de 65,2; o grupo 2 – 92,6; o grupo 3 – 105,5; o grupo 4 – 128,7 e o grupo 5 – 171,0. Na análise estatística, realizou-se a ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados mostraram que todos os grupos experimentais apresentaram valores estatisticamente significativos comparados ao grupo controle, sendo que o grupo 5 apresentou a menor área de necrose e o maior número de vasos quando comparado aos demais grupos deste estudo (p<0,01). O teste de correlação linear de Pearson indicou alta correlação negativa entre a porcentagem de necrose e o número de vasos dos retalhos (-0,972 / p=0,0001). **Conclusão:** O *laser* de baixa intensidade (670nm) aplicado com fluência de 24J/cm² foi mais eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, comparado às outras fluências utilizadas neste estudo.

Palavras-chave: retalhos cirúrgicos, terapia *laser* de baixa intensidade, cicatrização, fluência.

ABSTRACT

BOSSINI, P. S. **Low level laser therapy (670nm) on the viability of random skin flap in rats.** 2007. 132 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC, FMRP, IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Introduction: Skin flaps are widely used in plastic surgery, mainly in repair surgeries. After this reconstructive procedure, one of the main consequences is the decrease of blood flow in the area, which can be responsible by tissue necrosis. In this context, a lot of studies have investigated treatments able to increase the viability of the flap and the low level laser therapy (LLLT) has been chosen as an efficient treatment to reduce post-injury inflammatory processes and to stimulate the formation of new blood vessels. However, the use of a wide range of fluences by different authors and the lack of standardized experimental conditions make it difficult to compare published results. **Objective:** The aim of this study was to investigate the dose-response effects of 670nm laser on the viability of random skin flap in rats. **Methodology:** One hundred Wistar male rats were used in this study. The animals were divided into 5 groups: group 1 (control group); group 2 (treated with $3\text{J}/\text{cm}^2$); group 3 (treated with $6\text{J}/\text{cm}^2$); group 4 (treated with $12\text{J}/\text{cm}^2$) and group 5 (treated with $24\text{J}/\text{cm}^2$). The skin flap was made on the back of all animals studied (dimensions: $10 \times 4\text{cm}$) and before the sutures were done, a plastic sheet was interposed between the flap and the donor site. Laser irradiation was performed immediately after the surgery and on days 1, 2, 3 and 4 post-surgery. The irradiation was made punctually, on 24 points on the skin surface and around it. The percentage of the necrosis area of the flap was calculated by the paper template method at the day 7 postoperative. Moreover, a sample of the skin flaps was collected from 10 rats of each group, which were chosen aleatory, to performe the count of the blood vessels. **Results:** The animals of all treated groups showed statistically significant differences when compared to the control group (necrosis area: 49, 92%). The necrosis area of the treated groups were 41,82% (group 2), 36,51% (group 3), 29,45% (group 4) and 20,37% (group 5). In the count of blood vessels, group 1 showed the mean of 65,2; group 2 – 92,6; group 3 – 105,5; group 4 – 128,7 and group 5 – 171,0. The ANOVA test, followed by the Tukey test, for multiple comparasions were used. The results showed that all experimental groups showed statistically lower values for the necrosis area compared to the control and a higher number of blood vessels in the skin flap. It can be observed that the best results were found in the animals of group 5 ($p < 0,01$). In addition, the Pearson coefficient showed a significant negative correlation between necrosis area and the number of vessels ($-0,972 / p = 0,0001$). **Conclusion:** This present study has demonstrated that the 670nm laser was efficient to increase the viability of the skin flap, at all fluences used, with a tendency of reaching better results at higher dosages ($24\text{J}/\text{cm}^2$).

Key words: surgical flaps, low level laser therapy, wound healing, fluence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Al-Ga-In-P	= alumínio-gálio-índio-fósforo
AMP	= adenosina monofosfato
ANOVA	= análise de variância
As-Ga	= arseneto de gálio
As-Ga-Al	= arseneto de gálio e alumínio
ATP	= adenosina trifosfato
°C	= graus Celsius
Ca ⁺²	= íon cálcio
CEEA	= Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	= centímetro
cm ²	= centímetro ao quadrado
CO ₂	= dióxido de carbono
DNA	= ácido desoxirribonucléico
eV	= elétronVolt
G	= grupo
HE	= hematoxilina – eosina
He-Ne	= hélio-neônio
J	= joule
J/cm ²	= joule por centímetro ao quadrado
KCl	= cloreto de potássio
<i>Laser</i>	= amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LLLT	= terapia <i>laser</i> de baixa intensidade

mg/kg	= miligrama por quilograma de massa corporal
mm	= milímetro
mW	= miliWatts
mW/cm ²	= miliWatts por centímetro ao quadrado
n	= número da amostra
nm	= nanômetro
ns	= não significativo
O ₂	= oxigênio
P	= potência útil
pH	= potencial hidrogeniônico
RNA	= ácido ribonucleico
s	= segundo
s/cm ²	= segundo por centímetro ao quadrado
SOD	= superóxido-dismutase
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
UNESP	= Universidade Estadual Paulista
USP	= Universidade de São Paulo
UV	= ultra-violeta
VEGF	= fator de crescimento endotelial vascular
W	= Watts
W/cm ²	= Watts por centímetro ao quadrado
<	= menor
>	= maior
**	= altamente significativo

*	= significativo
λ	= comprimento de onda
μm	= micrômetro
%	= porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da Lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa uma condição pré-limiar, ou seja, sem ativação biológica (em repouso); (b) representa a bioestimulação: ativação dos processos biológicos (“janela terapêutica”); e (c) bioinibição: inibição dos processos biológicos.....	34
Figura 2 – Equipamento emissor da radiação <i>laser</i> (Ibramed – Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda [®]).....	57
Figura 3 – Esquema ilustrativo da demarcação dos pontos de aplicação da radiação <i>laser</i>	59
Figura 4 – Retalho planejado (10 X 4cm).....	60
Figura 5 – Retalho cutâneo randômico de base cranial elevado.....	61
Figura 6 – Posicionamento da barreira plástica (10 X 4cm) entre o retalho e o leito doador.....	62
Figura 7 – Retalho suturado após a interposição da barreira plástica.....	63
Figura 8 – Técnica de aplicação pontual em contato com utilização do molde plástico.....	64
Figura 9 – Molde de todo o retalho demarcado em papel vegetal.....	65
Figura 10 – Molde de todo o retalho com delimitação entre a área necrosada e a área viável.....	66

Figura 11 – Representação da amostra do retalho cutâneo coletado para a realização das lâminas histológicas.....67

Figura 12 – Desenho esquemático da distribuição da porcentagem de necrose dos retalhos por grupo (G1 – Controle; G2 – 3J/cm²; G3 – 6J/cm²; G4 – 12J/cm²; G5 – 24J/cm²), onde os pontos vermelhos indicam a média da porcentagem de necrose, a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana e os asteriscos indicam a presença de pontos atípicos.....73

Figura 13 – Desenho esquemático da distribuição de vasos sanguíneos dos retalhos por grupo (G1 – Controle; G2 – 3J/cm²; G3 – 6J/cm²; G4 – 12J/cm²; G5 – 24J/cm²), onde os pontos vermelhos indicam a média de vasos sanguíneos e a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana.....77

Figura 14 A e B – Fotomicrografias representativas de retalhos cutâneos mostrando os vasos sanguíneos (indicados pelas setas) na região próxima à linha de transição entre o tecido viável e o necrótico. **A:** grupo controle. **B:** grupo submetido à irradiação *laser* com fluência de 24J/cm². Coloração HE. (barra = 100µm).....78

Figura 15 – Desenho esquemático das distribuições das massas corporais dos ratos. Os pontos vermelhos representam as médias das massas dos animais por grupo e a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana.....112

Figura 16 – Resíduos *versus* ordem dos dados.....114

Figura 17 – Dispersão das massas corporais dos ratos nos diferentes grupos estudados.....115

Figura 18 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.....116

Figura 19 – Resíduos *versus* ordem dos dados.....121

Figura 20 – Dispersão das porcentagens de áreas de necrose dos retalhos por grupo.....	122
Figura 21 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.....	123
Figura 22 – Resíduos <i>versus</i> ordem dos dados.....	127
Figura 23 – Dispersão dos números de vasos sangüíneos dos retalhos por grupo.....	128
Figura 24 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem da área de necrose dos retalhos no sétimo dia pós-operatório.....	72
Tabela 2 – Dados descritivos da porcentagem de necrose dos retalhos nos diferentes grupos estudados.....	73
Tabela 3 – Resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.....	74
Tabela 4 – Número de vasos sangüíneos da amostra dos retalhos nos animais avaliados.....	76
Tabela 5 – Dados descritivos da contagem de vasos sangüíneos nos diferentes grupos estudados.....	76
Tabela 6 – Resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.....	79
Tabela 7 – Principais estudos com a utilização do <i>laser</i> na viabilidade dos retalhos cutâneos.....	87
Tabela 8 – Massa corporal dos ratos (em gramas).....	111
Tabela 9 – Dados descritivos das massas corporais dos ratos (em gramas).....	112

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVO.....	26
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3.1 <i>Laser</i> de Baixa Intensidade.....	28
3.1.1 Histórico.....	28
3.1.2 Características da Radiação <i>Laser</i>	30
3.1.3 Princípios Gerais dos Equipamentos de <i>Laser</i>	31
3.1.4 Parâmetros da Irradiação.....	32
3.1.5 Penetração da Luz nos Tecidos.....	35
3.1.6 Efeitos do <i>Laser</i> no Tecido Biológico.....	36
3.2 Retalho Cutâneo.....	44
3.3 <i>Laser</i> na Viabilidade do Retalho Cutâneo.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1 Animais de Experimentação.....	56
4.2 Equipamento Emissor da Radiação <i>Laser</i>	56
4.3 Delineamento Experimental.....	57
4.4 Técnica Operatória.....	59

4.5	Método de Determinação de Porcentagem da Área de Necrose dos Retalhos.....	64
4.6	Coleta da Amostra do Retalho Cutâneo.....	66
4.7	Eutanásia dos Animais.....	68
4.8	Preparação das Amostras.....	68
4.9	Contagem dos Vasos Sangüíneos.....	68
4.10	Análise Estatística.....	69
5.	RESULTADOS.....	72
5.1	Porcentagem da Área de Necrose.....	72
5.2	Contagem dos Vasos Sangüíneos.....	75
6.	DISCUSSÃO.....	8
2		
7.	CONCLUSÕES.....	96
8.	REFERÊNCIAS.....	98
	FONTES CONSULTADAS.....	108
	APÊNDICES.....	111

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os retalhos cutâneos são amplamente utilizados na cirurgia plástica, principalmente na reparadora (FERREIRA, 1995), sendo essenciais na reconstrução funcional e estética de falhas congênitas, traumáticas ou de origens neoplásicas (IM; LEE; HOOPES, 1990).

Após o procedimento operatório, uma das principais complicações é a isquemia, podendo ocasionar a necrose do retalho e, conseqüentemente, o insucesso do tratamento proposto (KJARTANSSON; LUNDEBERG, 1990; SALMI; HONG; FUTRELL, 1999; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; FREIRE *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2006).

Segundo Kerrigan (1983), a perda do retalho cutâneo pode ser atribuída a causas extrínsecas e intrínsecas. As causas extrínsecas incluem algumas condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão, má-nutrição) e causas locais (compressão, tensão, trombose anastomótica ou torção do pedículo). Essas causas extrínsecas, na maioria das vezes, podem ser minimizadas por meio de cuidados pré e pós-operatórios adequados. Em contraste à pluralidade de fatores extrínsecos, o principal fator intrínseco conhecido é a insuficiência arterial do retalho. Essa complicação seria explicada pelo seccionamento de vasos cutâneos e de terminais nervosos simpáticos devido à elevação do retalho, que provocaria a diminuição do fluxo sangüíneo ao longo do mesmo.

Na tentativa de realizar os retalhos cutâneos com mais segurança, pesquisadores começaram a estudar técnicas relacionadas ao aumento do aporte sangüíneo com o intuito de melhorar a condição isquêmica e, assim, aumentar a área de viabilidade do retalho (KERRIGAN, 1983; IM; LEE; HOOPES, 1990; GHERARDINI *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 1999; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002).

Na literatura, existem vários estudos utilizando diferentes tipos de drogas, como as vasodilatadoras, bloqueadoras de canais de cálcio, inibidoras de prostaglandinas, antiadrenérgicas, anticoagulantes e antioxidantes (JURELL; JONSSON, 1976; ASAI; FUKUTA; TORII, 1997; GHERARDINI *et al.*, 1998; SCHANAIDER *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 1999; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; TYNER *et al.*, 2006), no entanto, algumas dessas drogas podem desencadear alguns efeitos sistêmicos indesejados, tornando-se, portanto, inviáveis na prática clínica (JURELL; JONSSON, 1976; DAVIS *et al.*, 1999; SCHANAIDER *et al.*, 1999).

Diversos pesquisadores também têm investigado a ação de recursos não-farmacológicos, como a acupuntura e a eletroacupuntura (JANSEN *et al.*, 1989; NIINA *et al.*, 1997), correntes elétricas de baixa frequência polarizadas (IM; LEE; HOOPE, 1990) e não-polarizadas (KJARTANSSON; LUNDEBERG, 1990; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002), energia eletromagnética pulsada (KRAG *et al.*, 1979) e o *laser* de baixa intensidade (KAMI *et al.*, 1985; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; BALDAN, 2005).

A radiação *laser* de baixa intensidade é uma modalidade terapêutica frequentemente utilizada na aceleração do processo cicatricial de feridas por favorecer o aumento do fluxo sanguíneo e da neoformação vascular (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; SCHINDL *et al.*, 1999; ORTIZ *et al.*, 2001; REDDY, 2003). Em virtude desses efeitos, a terapia *laser* de baixa intensidade começou a ser estudada com o objetivo de melhorar a viabilidade de retalhos cutâneos (KAMI *et al.*, 1985; OHSHIRO; FUJINO, 1993).

Um dos primeiros trabalhos realizados com esse propósito foi desenvolvido por Kami *et al.* (1985), que investigaram os efeitos do *laser* de diodo (830nm) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos e concluíram que o aumento da área de viabilidade dos retalhos

ocorreu devido à proliferação de vasos sanguíneos ao redor dos pontos irradiados e ao aumento da perfusão vascular.

Nesse sentido, outros estudos foram realizados (SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA; OHSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005), contudo, nota-se uma discrepância na literatura em relação aos parâmetros do *laser* de baixa intensidade, principalmente a respeito da fluência utilizada no tratamento dos retalhos cutâneos.

Deste modo, são necessários novos trabalhos para avaliar os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade dos retalhos cutâneos, objetivando um tratamento mais efetivo e um melhor entendimento dos mecanismos de ação desse recurso terapêutico.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Verificar o efeito de diferentes fluências do *laser* de baixa intensidade ($\lambda = 670\text{nm}$) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

3.1.1 Histórico

O termo *LASER* é um acrônimo de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, que significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”, sendo esse o princípio em que foi baseada sua criação (COLLS, 1985; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 1999; LOW; REED, 2001).

O fenômeno físico da emissão estimulada de radiação foi inicialmente postulado por Albert Einstein em 1916. Baseados nesse princípio, em 1951, Towes, Gordon e Zeiger construíram um instrumento emitindo radiação na faixa das microondas que ficou conhecido como *MASER* ou amplificador de microondas por emissão estimulada de radiação, criando, portanto, a possibilidade de trabalhar na região do espectro visível (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; TUNER; HODE, 1999).

Em 1960, o Dr. Theodore H. Maiman propôs a primeira produção de radiação *laser* com um material sólido utilizando o cristal de rubi, dentro da faixa vermelha do espectro eletromagnético. Em meados dos anos 60, Javan, Bennett e Herriott construíram o *laser* de hélio-neônio (He-Ne), que se tornou a primeira fonte de luz coerente disponível comercialmente, recebendo o nome de *cold laser* ou *soft laser* (KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 1999).

Após a descoberta do *laser* de He-Ne, surgiu o interesse em produzir um equipamento com emissão na faixa do infravermelho. Porém, esses aparelhos só apareceram no final da década de

70 com o surgimento da tecnologia dos diodos semicondutores que possibilitou a confecção de equipamentos de arseneto de gálio (As-Ga) e de arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al) (OHSHIRO, 1991; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 1999).

Os trabalhos iniciais da terapia com *laser* de baixa intensidade começaram no final da década de 60 e início dos anos 70 na Europa Oriental, sendo fortemente baseados nos estudos do Prof. Endre Mester, de Budapest, onde foram observados os efeitos dessa radiação na modulação dos processos biológicos. Desde então, a LLLT (*Low Level Laser Therapy*) tornou-se uma modalidade de tratamento popular, principalmente na União Soviética e na Europa Oriental (BASFORD, 1989; KITCHEN; BAZIN, 1996).

No ocidente, um dos primeiros trabalhos foi o do Dr. Friedrich Plog em 1973, que estudou os efeitos do *laser* em pontos de acupuntura (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1997). Posteriormente, o termo *Low Reactive-Level Laser* ou *Low Level Laser Therapy* (LLLT, que significa Terapia *Laser* de Baixa Intensidade), criado por Ohshiro e Calderhead em 1988, tornou-se internacionalmente aceito para descrever os aspectos clínicos desse tipo de aplicação (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; OHSHIRO; FUJINO, 1993). Em 1998, Calderhead propôs a terminologia *Laser Therapy* para designar o *laser* operando em baixa potência; desse fato derivou a terminologia *laser* terapêutico.

A partir desse momento, iniciou-se a aplicação do *laser* de baixa intensidade em diversas enfermidades, pesquisas e experimentações, obtendo-se, assim, mais conhecimentos sobre os efeitos fisiológicos, mecanismos de ação e aperfeiçoamento dos aparelhos (BASFORD, 1989; BAXTER *et al.*, 1991).

3.1.2 Características da Radiação *Laser*

A luz *laser* apresenta características especiais que a diferenciam de outras fontes luminosas e que estão relacionadas ao processo de sua produção, ou seja, a emissão estimulada de radiação, sendo elas: a monocromaticidade, a coerência, a colimação e a polarização (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 1999).

A monocromaticidade indica que a radiação é constituída de fótons com um único comprimento de onda e, portanto, uma só cor. Essa característica determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente, contribuindo para o melhor entendimento da interação fotobiológica e dos efeitos terapêuticos específicos (KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001).

A radiação *laser*, além de possuir um único comprimento de onda, possui a mesma fase, ou seja, os picos e as depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo (coerência temporal) e na mesma direção (coerência espacial), sendo essa outra característica que difere a luz *laser* da luz comum (BAXTER, 1997).

A colimação consiste no alto grau de paralelismo do feixe *laser* indicando uma ínfima divergência, de tal forma que a luz mantém um pequeno tamanho de saída do feixe por uma longa distância. Esse efeito de colimação é responsável pelos perigos oculares gerados (TUNER; HODE, 1999; LOW; REED, 2001).

A polarização ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, de tal modo que as vibrações em seus campos elétricos acontecem em uma única direção. Essa propriedade, por sua vez, caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si (TUNER; HODE, 1999; LOW; REED, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2004).

3.1.3 Princípios Gerais dos Equipamentos de *Laser*

A radiação *laser* é produzida quando um átomo encontra-se em seu estado excitado, cujos elétrons podem retornar para níveis mais baixos de energia a partir da estimulação (colisão) por um fóton incidente. Quando o elétron sofre esse salto quântico e retorna para a sua órbita original, ele emite um fóton de luz com as mesmas características do fóton incidente. Esse fenômeno caracteriza a emissão estimulada de radiação, que sofre um efeito de amplificação, proporcionando uma grande quantidade de fótons idênticos por meio da rápida excitação do meio gerador da radiação (KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; LOW; REED, 2001).

A quantidade de energia liberada na forma de um fóton, cuja unidade é expressa em elétronVolt (eV), determinará o comprimento de onda da luz emitida, o qual apresenta uma relação inversamente proporcional, ou seja, comprimentos de onda curtos estão relacionados com fótons carregando altas quantidades de energia (BAXTER, 1997).

A grande variabilidade de carga energética dos fótons determina a existência de uma vasta quantidade de radiações, que passaram a ser classificadas dentro de um espectro eletromagnético. Os *lasers* de baixa intensidade mais usados, e que na prática clínica e laboratorial são chamados de *lasers* terapêuticos, encontram-se em uma faixa de espectro variando entre o visível e o infravermelho. O intervalo espectral mais utilizado está entre os comprimentos de onda de 630 a 980nm (nanômetros), constituindo a chamada “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997).

3.1.4 Parâmetros da Irradiação

Diversos são os parâmetros que descrevem os equipamentos de *laser*, sendo eles: o comprimento de onda, a potência óptica útil, a densidade de potência (ou irradiância), a fluência (densidade de energia ou dosimetria), o tipo de feixe e a frequência de tratamento (KITCHEN; BAZIN, 1996; TUNER; HODE, 1999; LOW; REED, 2001).

➤ Comprimento de onda (λ): consiste na distância entre dois picos (ponto mais alto) ou dois vales (ponto mais baixo) de cada onda, ou seja, é a distância percorrida por um ciclo, cuja unidade que o representa é uma fração do metro, expressa em nanômetros (nm). Este parâmetro é considerado o fator determinante dos efeitos fisiológicos, pois determina quais biomoléculas absorverão a radiação (LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993a; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; KARU, 1998).

➤ Potência óptica útil (P): consiste na energia emitida em um segundo, cuja unidade é comumente expressa em Watts (W) ou em miliWatts (mW). Os *lasers* terapêuticos normalmente operam com potências de saída inferiores a 1W. Um *laser* será mais potente quanto maior for a energia gerada por segundo, tendo em vista que a efetividade da radiação *laser* baseia-se na quantidade suficiente de energia que, absorvida, promoverá modificações em algumas reações. No entanto, não existem dados conclusivos a respeito da potência ideal a ser usada (KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997).

➤ Densidade de potência (ou irradiância): consiste na potência de saída da luz por unidade de área de irradiação, geralmente expressa em mW/cm² ou W/cm². Esse parâmetro comumente é mantido em nível mais alto quando se utiliza a técnica de tratamento por contato (superfícies em tratamento pressionadas firmemente pelo aplicador da fibra óptica), tendo em vista a ocorrência

de maior concentração de fótons por unidade de área quando comparada ao uso sem contato com o tecido alvo (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997).

➤ Fluência (densidade de energia ou dosimetria): consiste na energia total transmitida por um feixe *laser* por unidade de área e é expressa em J/cm². Para calcular a fluência, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Fluência (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{potência (W)} \times \text{tempo (s)}}{\text{área de irradiação (cm}^2\text{)}}$$

A fluência ótima para a laserterapia de baixa intensidade ainda permanece controversa. O cálculo preciso e o registro das fluências para todas as aplicações é fundamental, de forma que os tratamentos possam ser aplicados com segurança (BAXTER, 1997; ORTIZ *et al.*, 2001).

A fluência ideal da radiação *laser* depende de vários fatores, dentre eles: a distância entre a pele e a peça de mão (do inglês, *probe*), a metodologia de aplicação, o sistema óptico de condução da luz (direto ou com fibra óptica), a profundidade do tecido, as características que são inerentes à irradiação do *laser* sobre o tecido alvo, ou seja, reflexão, refração, dispersão, transmissão e absorção do feixe, bem como o tecido a ser irradiado e seu estado fisiológico prévio (BECKERMAN *et al.*, 1992; BAXTER, 1997).

Segundo alguns autores (TIPHLOVA; KARU, 1987; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; LONGO; MESTER, 1998; LOW; REED, 2001), acredita-se que exista uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione uma fotoinibição. Esse conceito foi descrito como Lei de Arndt-

Schultz, que prediz a existência de um efeito dose-dependente representado por uma curva fluência *versus* resposta biológica (figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática da Lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa uma condição pré-liminar, ou seja, sem ativação biológica (em repouso); (b) representa a bioestimulação: ativação dos processos biológicos (“janela terapêutica”); e (c) bioinibição: inibição dos processos biológicos.

Karu (1989) sugere que a eficácia da radiação *laser* está intensamente relacionada com uma fluência adequada, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que fluências baixas ou altas podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos, respectivamente.

Karu (1987) reporta também que baixas fluências regulam ou aceleram o transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, enquanto que fluências elevadas causam danos nesses transportadores da cadeia.

O tipo de feixe depende do sistema *laser* e de sua configuração, podendo operar de modo pulsado ou contínuo (KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; LOW; REED, 2001). Quanto à frequência de tratamento ideal, este parâmetro ainda não se encontra determinado na literatura científica, de modo que existem relatos de aplicações variando desde uma frequência diária até aplicações a cada dois dias ou duas vezes por semana. Existem também outros estudos em que foram realizadas apenas uma ou duas aplicações, com objetivo de verificar os efeitos específicos sobre uma atividade biológica (KARU, 1989; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993a; LOW; REED, 2001).

3.1.5 Penetração da Luz nos Tecidos

Os efeitos da radiação *laser* com a matéria são os mesmos de qualquer outra radiação eletromagnética equivalente, ocorrendo os eventos de reflexão, refração, dispersão e absorção (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993a, 1993b; KLOTH, 1997; LOW; REED, 2001).

A primeira interação da luz com a pele acontece na superfície do estrato córneo, onde cerca de 5% a 7% da radiação incidente é refletida (PARRISH; DEUTSCH, 1984). A aplicação em contato perpendicular da fonte *laser* com a superfície da pele durante a irradiação, aumenta a profundidade de penetração devido à redução da reflexão e dispersão (GREATHOUSE; CURRIER; GILMORE, 1985; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993b; BAXTER, 1997).

Cerca de 93% a 97% da radiação que penetra nos substratos subsequentes passa a ser dispersa por reflexão interna, refração, divergência e ainda atenuada por absorção. A reflexão

interna múltipla pode acontecer como resultado da não homogeneidade da pele e dos tecidos profundos. Além disso, a grande variabilidade nos índices de refração dos componentes teciduais promove mudanças na direção de propagação do feixe, provocando um alargamento do mesmo durante sua passagem através do tecido irradiado, o que resulta, por fim, em uma rápida perda da coerência (GONZÁLES; COLLS, 1988; LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993b; KITCHEN; BAZIN, 1996; LOW; REED, 2001).

Ao passo que a luz é absorvida e dispersa pelos tecidos do corpo, há uma redução no efeito da radiação em proporção direta à sua penetração, atenuando a luz em diferentes frequências e em diferentes graus (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; OHSHIRO, 1991). Apesar disso, a extensão da ação fotoquímica permite atuar indiretamente já que afeta estruturas bastante profundas como a 5cm (LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993b), devido aos processos químicos que podem ser iniciados de forma mais superficial, expandindo-se para efeitos mais profundos e até sistêmicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

3.1.6 Efeitos do *Laser* no Tecido Biológico

Uma vez absorvida, a energia *laser* pode fazer com que as biomoléculas específicas alcancem um estado de excitação eletrônica em que são capazes de sofrer reações químicas como oxidação, redução, isomerização, ruptura de ligações covalentes ou interações com outras biomoléculas (PARRISH; ROSEN; GANGE, 1985).

No aspecto molecular, podem acontecer três situações (PARRISH; ROSEN; GANGE, 1985; KARU, 1987; BAXTER, 1997):

- excitação das cadeias de elétrons nas mitocôndrias, gerada pela região visível do espectro e infravermelho próximo. As moléculas excitadas apresentam um maior potencial para gerar reações químicas, induzindo um observável efeito biológico;
- vibrações moleculares, que consistem em estiramento e batimento das ligações que causam deslocamentos dos núcleos atômicos, mas não afetam suas posições de equilíbrio. Essas vibrações são geradas pela absorção da irradiação infravermelha;
- rotação total da biomolécula, ou parte dela, ao redor de um eixo gerado pelo campo eletromagnético da luz incidente, podendo ocorrer um discreto aumento da temperatura.

As radiações ópticas podem ou não ser ionizantes e sua ação pode ser fotoquímica, para as radiações ultravioletas, ou termais, para a faixa infravermelha do espectro. A região visível permanece entre esses dois extremos, sendo considerada uma região de transição caracterizada pelos dois efeitos: termais e fotoquímicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

A terapia *laser* de baixa intensidade acontece em intensidades tão baixas que não se sabe ao certo se alguns efeitos biológicos ocorrem em decorrência dos efeitos diretos da radiação ou como resultado do aquecimento.

Basford (1989) reportou aumentos de temperatura tão pequenos como 0,1 a 0,5 graus Celsius (°C), considerando a utilização de baixas fluências e potências de 50mW ou menos. Um aumento de temperatura de 0,4 a 0,6°C na pele irradiada por um *laser* diodo de As-Ga de 850nm e 70mW, também foi relatado por Boussignac *et al.* (citado por KARU *et al.*, 1990).

Alguns autores afirmam que os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade são baseados em mecanismos não-termais, que não geram um aumento significativo da temperatura dos

tecidos (HONMURA *et al.*, 1993; KITCHEN; BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

As densidades de potência normalmente empregadas na terapia *laser* de baixa intensidade são inferiores a $200\text{mW}/\text{cm}^2$, não causando aumento considerável da temperatura nos tecidos (SCHAFFER *et al.*, 1997). Isso é demonstrado no trabalho de Rochkind *et al.*, (1988) no qual a temperatura não alterou mais que $0,1^\circ\text{C}$, que é bem baixa para o mínimo necessário para influenciar a atividade celular (citado por BRAVERMAN *et al.*, 1989).

Durante os estados de excitação eletrônica, uma importante fração de energia excitada é convertida em calor, o que gera aumento na temperatura dos cromóforos absorventes, sendo um possível mecanismo de ação do *laser*. Porém, deve-se notar que o aquecimento local e transitório das moléculas absorventes difere do aquecimento celular total, o que não é observado nas fluências e intensidades usadas em estudos com culturas celulares (KARU, 1995).

A bioestimulação *laser*, ou reações *laser* catalisadas, referem-se à aplicação de energia eletromagnética pelo *laser* de baixa intensidade nos tecidos biológicos que, por sua vez, pode influenciar as funções celulares com a estimulação ou a inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Porém, devido à estimulação e a inibição serem possíveis, o termo biomodulação é ultimamente usado para nomear os dois efeitos (BECKERMAN *et al.*, 1992; SCHAFFER *et al.*, 1997; DE BIE *et al.*, 1998).

A magnitude do efeito biomodulatório ou fotobiorregulador atribuído à terapia *laser* de baixa intensidade ao interagir com os tecidos biológicos é referido como sendo dependente do comprimento de onda, fluência e densidade de potência, assim como da frequência de tratamento, do tipo de lesão e do espectro específico de absorção dos cromóforos moleculares (KARU, 1987;

HARRIS, 1991; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BECKERMAN *et al.*, 1992; BASFORD, 1995; DE BIE *et al.*, 1998; KIPSHIDZE *et al.*, 2001).

Segundo Karu (1987), existem razões para achar que o fenômeno de biomodulação é de natureza fotobiológica. Isso porque, de acordo com seus estudos, a inibição em alguns processos biológicos ocorre pela fotodestruição de um ou mais citocromos da cadeia respiratória. Os efeitos cumulativos em aplicações repetidas também resultam em um efeito inibitório (MESTER E; MESTER AF; MESTER A, 1985). Assim, pode-se dizer que a radiação *laser* de baixa intensidade resulta em modulação das atividades celulares (SCHAFFER *et al.*, 1997).

O efeito bioestimulante do *laser* sofreu várias tentativas de explicação por meio de algumas teorias. A primeira delas foi o princípio de Arndt-Schultz, o qual propõe que os tecidos reagem à quantidade de energia absorvida por unidade de tempo, de tal maneira que estímulos fracos excitam a atividade fisiológica, enquanto aqueles muito fortes irão anulá-la (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997).

Kleinkort e Foley (1990 citados por KLOTH, 1997) postularam uma outra teoria para explicar esse efeito, afirmando que o *laser* pode estimular a formação de ATP como depósito de energia. O ATP estimulará a atividade enzimática para que os processos fisiológicos normais sejam restaurados em nível celular e do organismo em geral.

Beckerman *et al.* (1992) propuseram que quando há uma alteração no estado de energia celular, há alteração da comunicação celular que será influenciada diretamente pela terapia *laser*.

Segundo Ortiz *et al.* (2001), a teoria fotoquímica é, atualmente, a mais estudada e fundamentada, oferecendo uma explicação para a sensibilidade das células à luz *laser*. Essa teoria considera que a energia eletromagnética estimula moléculas fotorreceptoras ou cromóforos, os

quais respondem a uma faixa específica de luz, realizando assim, a conversão em energia fotoquímica.

Esses cromóforos são um grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas ou qualquer outra substância capacitada a absorver luz e apresentam etapas comuns na realização dos efeitos causados pelas diferentes faixas de luz (BECKERMAN *et al.*, 1992; KARU, 1998).

Além disso, os cromóforos têm sido definidos como componentes da cadeia respiratória, de diferentes tamanhos e formas, que atuarão ou ressonarão com uma estimulação específica ou energia de radiação. Podem transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes da célula, envolvidos na cadeia respiratória mitocondrial. Dependendo do comprimento de onda, a radiação eletromagnética na forma de luz pode estimular macromoléculas, iniciar mudanças na conformação de proteínas e transferir energia aos elétrons (WILDEN; KARTHEIN, 1998).

No entanto, Baxter (1997) considera como moléculas responsáveis pela absorção da luz, os aminoácidos e os ácidos nucleicos e, como cromóforos, a melanina e a hemoglobina. Os aminoácidos têm alta absorção na faixa intermediária do espectro ultravioleta (UV) e também em comprimentos de onda menores que do UV; os ácidos nucleicos possuem seu espectro de absorção nas mesmas faixas dos aminoácidos e também na região do infravermelho, já os cromóforos absorvem luz na região visível do espectro.

Stadler *et al.*, (2000) relataram que a hemoglobina, presente nas células sanguíneas vermelhas, pode atuar como um cromóforo, tomando parte na absorção de fotoirradiações com comprimentos de onda na faixa entre 600nm a 700nm, o que foi comprovado por ter intensificado os efeitos da irradiação de $5\text{J}/\text{cm}^2$ sobre as culturas de linfócitos, com aumento da enzima

superóxido-dismutase (SOD), a qual atua como antioxidante, eliminando os superóxidos em excesso.

Como os efeitos da biomodulação possuem um amplo intervalo espectral, assume-se que devem ser diferentes cromóforos os alvos fotorreceptores, e isso pode depender de cada órgão ou da localização e concentração dos fotorreceptores (SCHAFFER *et al.*, 1997; SROKA *et al.*, 1999).

É proposta, como mecanismo primário de ação, a possibilidade de ocorrência de quatro respostas a partir da incidência da radiação *laser* sob as moléculas fotorreceptoras: (1) mudanças no estado redox e aceleração na transferência de elétrons; (2) alterações na atividade bioquímica e estrutural pelo aquecimento transitório dos cromóforos; (3) aumento da produção de superóxido e (4) geração de oxigênio molecular. Na sequência, os mecanismos secundários de ação consequentes às reações bioquímicas e/ou biofísicas iniciadas correspondem à transdução do fotossinal e à amplificação ao núcleo por uma cascata de reações ocorridas no citoplasma e na membrana celular, sendo conectadas às alterações dos parâmetros de homeostase celular (pH, concentração de Ca^{+2} , AMP cíclico, ATP e outros), que acontecem minutos ou horas após a irradiação. Isso leva a possíveis mudanças na taxa de síntese de DNA e RNA, alterações na taxa do consumo de O_2 , alteração do potencial de membrana, entre outras (KARU, 1987; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KARU; PYATIBRAT; KALEND, 1995; BAXTER, 1997; KARU, 1998, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001).

A fotossensibilidade das células não é um fenômeno do tipo “tudo ou nada”, sendo que as células podem responder aos estímulos da luz em vários graus. A magnitude da fotorresposta está relacionada ao estado fisiológico prévio à irradiação, o qual é condicionado, no caso de cultura celular, por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e pela idade da cultura. No caso

de uma baixa concentração de oxigênio e queda do pH, o que provoca a alteração do estado redox celular, ocorrerá influência na resposta biológica a irradiação. Portanto, a resposta celular será fraca ou ausente quando o potencial redox for ótimo, e forte quando esse encontrar-se alterado (KARU; 1987, 1995, 1998).

Com isso, conclui-se que o *laser* tem melhores efeitos sobre órgãos e tecidos afetados por uma condição deteriorada, como quando o paciente sofre algum tipo de desordem funcional ou lesão tecidual (TUNER; HODE, 1999).

Assim, evidências experimentais comprovam que a alteração do estado redox no sentido da oxidação está relacionada com o efeito estimulante do *laser*, enquanto que a alteração no sentido da redução, correlaciona-se com o efeito inibitório. Isso explica porque o efeito bioestimulante nem sempre é conseguido, havendo uma grande diversidade de resultados reportados na literatura (KARU, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001).

O *laser* gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos, afetando não só a área de atuação, mas também as regiões circundantes (TUNER; HODE, 1999). Os efeitos fotobiológicos podem, convencionalmente, ser divididos em curto prazo ou diretos e em longo prazo ou indiretos à radiação (KARU, 1998).

As respostas a curto prazo são aquelas em que o efeito do *laser* pode ser observado uns poucos segundos ou minutos após a irradiação. Entre elas, está a fotoestimulação da taxa respiratória e a síntese de ATP. Os efeitos a longo prazo são observados horas ou dias após o término da irradiação. Os três principais efeitos fisiológicos reportados na literatura sobre a terapia *laser* de baixa intensidade a longo prazo são: efeito antiinflamatório, efeito analgésico e efeito cicatrizante (KARU, 1987; 1998).

Segundo Baxter (1994) e Gogia (1995), a terapia *laser* de baixa intensidade vem sendo amplamente utilizada nas condições de processos cicatriciais, visando obter cicatrização mais rápida de feridas. Seu êxito deve-se às particularidades de respostas que induz nos tecidos, como diminuição do processo inflamatório, redução de edema, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização.

A irradiação *laser* de baixa intensidade tem sido observada também por aumentar e acelerar a formação de novos vasos após lesão tecidual (AGAIBY *et al.*, 2000).

De acordo com os estudos de Simunovic, Trobonjaca e Trobonjaca (1998), o tratamento com a terapia *laser* de baixa intensidade em pacientes com epicondilite lateral e medial promoveu um aumento na microcirculação do tecido afetado, aumentando o suprimento sanguíneo para as células e promovendo a remoção de catabólitos.

No experimento de Schindl *et al.* (1999), houve um aumento no número de vasos em úlceras cutâneas após a irradiação com *laser* de He-Ne por 4 semanas, sendo 2 vezes por semana, com potência de 10mW e fluência de 30J/cm². Segundo estes autores, há uma grande evidência sugerindo que o *laser* possa induzir a angiogênese *in vitro* e *in vivo*.

Ghali e Dyson (1992) relataram que a terapia *laser* pode estimular ou inibir a proliferação de células endoteliais, que são as principais células envolvidas com a angiogênese, dependendo do comprimento de onda e da fluência utilizada.

Agaiby *et al.* (2000) estudaram os efeitos do *laser* de As-Ga-Al, com comprimento de onda de 820nm, fluências de 1,2J/cm², 3,6J/cm², 6,0J/cm², 8,4J/cm² e potência de 50mW em culturas de linfócitos T humanos e demonstraram que a terapia *laser* é capaz de estimular indiretamente a proliferação de células endoteliais com as fluências menores (1,2J/cm² e

3,6J/cm²). Já as fluências de 6,0J/cm² e 8,4J/cm² mostraram efeitos inibitórios, o que leva à conclusão de que a síntese e secreção de fatores de crescimento angiogênicos em resposta à terapia *laser* é dose-dependente.

A possibilidade da terapia *laser* de baixa intensidade estimular a liberação e a secreção de fatores de crescimento relacionados com a angiogênese, em especial o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), foi investigada por Kipshidze *et al.* (2001), constatando que o *laser* de He-Ne, em modo contínuo, com potência de saída de 5mW, irradiado durante 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 minutos, aumentou a produção do VEGF em culturas de células musculares lisas, fibroblastos e miócitos cardíacos até 20 minutos de exposição. Após esse tempo, houve um decréscimo na produção desse fator de crescimento.

3.2 RETALHO CUTÂNEO

Segundo Ferreira (1995), os retalhos cutâneos são segmentos de pele obtidos de uma área doadora e transferidos para uma região receptora, mantendo uma conexão temporária ou definitiva, por meio de um pedículo de onde vem o suprimento sangüíneo. São caracterizados por apresentarem circulação própria, o que os tornam independentes da área receptora, para que assim possa ser assegurada a sua sobrevivência.

Os retalhos podem ser classificados quanto ao suprimento sangüíneo em randômicos ou axiais. Os randômicos não apresentam no pedículo um vaso predominante e previamente escolhido de acordo com as particularidades anatômicas da região doadora. A vascularização ocorre de modo aleatório, a partir de vasos comumente encontrados na área doadora e preservados no pedículo. Nos retalhos axiais, o pedículo é definido e recebe o fluxo sangüíneo das artérias

septocutâneas e cutâneas diretas. São projeções mais longas que enviam ramos para formar os plexos subdérmico e dérmico (FERREIRA, 1995).

Os retalhos cutâneos constituem um recurso utilizado com muita frequência na cirurgia plástica estética e reparadora, sendo a necrose a complicação mais temida (KUBOTA, 2002; CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004).

Em 1965, McFarlane, DeYoung, Henry, desenvolveram um modelo experimental para o estudo e a prevenção da necrose dos retalhos cutâneos em ratos. Esses retalhos tinham como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, para assegurar que os vasos sangüíneos acometidos fossem os mesmos. Os retalhos mediam 10cm de comprimento e 4cm de largura, perfazendo assim, uma proporção entre comprimento e largura de 2,5:1, e apresentavam uma porcentagem de necrose entre 25% a 50%. Os retalhos cutâneos eram elevados a partir da fáscia profunda dos músculos e continham a fáscia superficial, panículo carnosos e pele.

Kerrigan (1983) estudou retalhos cutâneos em porcos por meio de microesferas radioativas, com o objetivo de verificar os fatores fisiopatológicos da necrose do retalho. Segundo o autor, o insucesso dos procedimentos com retalhos cutâneos pode ser atribuído à causas extrínsecas e intrínsecas. As causas extrínsecas incluem algumas condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão, má-nutrição) e locais (compressão, tensão, trombose anastomótica ou torção do pedículo). Em contraste à pluralidade de fatores extrínsecos, o principal fator intrínseco conhecido é a insuficiência arterial do retalho. A fisiopatologia seria explicada pelo seccionamento de vasos cutâneos e terminais nervosos simpáticos, ocasionando uma diminuição progressiva do fluxo sangüíneo, em sentido distal, ao longo do retalho. Dessa forma, o autor

sugeriu que modalidades de tratamento que aumentem o influxo arterial para o retalho ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos devem ser escolhidas.

3.3 LASER NA VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO

Há relatos na literatura de que o *laser* de baixa intensidade promove um aumento da microcirculação e da neoformação vascular (OHSHIRO; FUJINO, 1993; BISHT *et al.*, 1999; MAEGAWA *et al.*, 2000; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; REDDY, 2003), podendo dessa forma melhorar a viabilidade dos retalhos cutâneos.

Kami *et al.* (1985) investigaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. O equipamento utilizado foi um *laser* de diodo (As-Ga-Al) com comprimento de onda de 830nm, potência de 15mW, emissão em modo contínuo e área da secção transversal do feixe de 0,02cm². Sessenta ratos foram distribuídos em 3 grupos (20 ratos em cada) e realizou-se o retalho cutâneo (9 X 3cm), de base caudal no dorso dos animais. O primeiro grupo foi considerado como controle, ou seja, o retalho foi elevado e imediatamente suturado na sua posição de origem, não sendo submetido à radiação *laser*. O segundo grupo foi irradiado no pré-operatório durante 5 dias e o terceiro, no pós-operatório também por 5 dias. As irradiações ocorreram em 18 pontos distribuídos ao longo de todo o retalho. Cada ponto foi irradiado por 20 segundos por dia e a fluência utilizada foi de 16J/cm² em cada ponto.

No 7º dia após o procedimento operatório, as áreas de viabilidade dos retalhos foram mensuradas e comparadas. No grupo controle, a média das áreas de viabilidade foi de 46,18%, no grupo de irradiação pré-operatória foi de 52,55% e no grupo irradiado no pós-operatório foi de

53,51%. Os resultados demonstraram um aumento significativo na área de viabilidade de ambos os grupos submetidos à irradiação laser, comparados ao grupo controle, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos irradiados. Observou-se também que o aumento na viabilidade dos retalhos ocorreu devido à proliferação de vasos sanguíneos observada ao redor dos pontos irradiados e pelo aumento de fluxo sanguíneo.

Smith *et al.* (1992) avaliaram os efeitos do *laser* de He-Ne (632,8nm e 2,75mW de potência) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos e porcos. Foram utilizados 20 ratos, distribuídos em 2 grupos, controle e irradiado, com 10 ratos em cada. Os retalhos, realizados no dorso dos animais, apresentavam dimensões de 2 X 7cm e base caudal. Nos porcos, foram realizados 8 retalhos de base medial (2 X 7cm) em 5 animais, sendo 4 retalhos de cada lado do animal. Um lado foi usado como controle e o lado contralateral foi tratado com o *laser*.

Os retalhos dos grupos experimentais (dos ratos e porcos) foram submetidos à radiação *laser* durante 10 dias: 4 dias no pré-operatório, 10 minutos antes da elevação do retalho no dia da operação (5º dia) e 5 dias no pós-operatório. Nas aplicações, utilizou-se a técnica de varredura (com distância de 1mm entre a peça de mão do *laser* e o retalho), uma vez ao dia, durante 30s/cm² e fluência de 0,082J/cm². A avaliação dos retalhos foi realizada no 5º dia pós-operatório, por meio de um papel milimetrado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental, tanto nos ratos quanto nos porcos.

Zhang *et al.* (1992) estudaram os efeitos do *laser* de dióxido de carbono (CO₂) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos de base cranial (2 X 7cm) em ratos. Foram utilizados 22 ratos, distribuídos em 2 grupos (controle e experimental) com 11 animais em cada. No grupo

controle os retalhos foram submetidos à simulação da radiação *laser*. No grupo experimental os retalhos foram irradiados no pós-operatório com o *laser* de CO₂ (desfocado), com comprimento de onda de 10.600nm, potência de 2W, área da secção transversal do feixe emissor de 6,67cm² e fluência de 18J/cm². A aplicação do *laser* foi realizada em três pontos do retalho (um na base cranial, outro no centro e o terceiro na região distal) com duração de 1 minuto por ponto, duas vezes ao dia, durante 7 dias.

No 14º dia pós-operatório realizou-se a avaliação da área de viabilidade dos retalhos. No grupo controle a média da área de tecido viável foi de 51,43% e no grupo experimental foi de 83,28%. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os dois grupos. Dessa forma, os autores concluíram que o *laser* de CO₂, nos parâmetros utilizados nesse estudo, promoveu o aumento na viabilidade dos retalhos cutâneos devido a uma melhora na resposta circulatória.

Kubota e Ohshiro (1996) examinaram os efeitos do *laser* de diodo (As-Ga-Al) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos, em ratos, por meio da fluxometria por *laser* Doppler. Foram utilizados 2 grupos de 10 ratos cada para a realização dos retalhos cutâneos de base caudal, com dimensões de 9 X 3cm. O primeiro grupo serviu como controle, sendo submetido à simulação da radiação *laser*. O segundo grupo recebeu a irradiação *laser* (830nm, 60mW de potência, fluência de 36J/cm² e modo contínuo de emissão) por 1 minuto em um único ponto medial, localizado a 2cm, em sentido distal, da base caudal do retalho. Para as aplicações, o *laser* foi posicionado em um suporte com a peça de mão mantida a 1cm do ponto a ser irradiado, não ocorrendo, portanto, o contato da mesma com o tecido alvo. Em ambos os grupos, utilizou-se

o *laser* Doppler para avaliar a microcirculação do retalho. As avaliações foram realizadas em 3 momentos distintos: 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, entretanto, 30 minutos pós-irradiação, houve um aumento significativo da perfusão microvascular. No 5º dia pós-irradiação, realizou-se a avaliação da área de viabilidade dos retalhos cutâneos, obtendo-se os seguintes resultados: 60,88% de área viável no grupo controle e 68,11% no grupo irradiado. A média das áreas de viabilidade dos retalhos no grupo irradiado foi significativamente maior comparada à do grupo controle.

Amir *et al.* (2000) estudaram a ação do *laser* de He-Ne na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos de base cranial (2,5 X 8cm) em ratos. Trinta ratos foram distribuídos em 3 grupos iguais. Nos 3 grupos, os retalhos foram elevados e imediatamente suturados na posição de origem. Os animais do grupo 1 (controle) foram os primeiros a serem submetidos ao procedimento operatório, porém, não foram irradiados. No 15º dia pós-operatório, realizou-se a avaliação e o comprimento médio da parte viável do retalho foi de 3,9cm da base cranial.

Utilizando este dado, os autores planejaram o tratamento dos outros 2 grupos. No grupo 2 os retalhos foram irradiados na zona de transição (ou seja, entre o tecido viável e a área onde se esperava a necrose – 3,5 a 5,5cm distalmente à base cranial) durante 5 minutos ao dia por 5 dias consecutivos após a operação, com fluência de $2,9\text{J}/\text{cm}^2$. No grupo 3 os retalhos foram irradiados na mesma zona de transição descrita no grupo 2, e também na porção distal (5,5 a 7,5cm da base

cranial) durante 10 minutos ao dia por 5 dias consecutivos após a operação, com a mesma fluência ($2,9\text{J}/\text{cm}^2$). O equipamento utilizado emitia comprimento de onda de $632,8\text{nm}$, potência de 6mW , feixe com 2cm de diâmetro e área de secção transversal de $3,14\text{cm}^2$.

Dez dias após a última irradiação, realizaram-se as avaliações dos retalhos. As médias das áreas de tecido viável foram as seguintes: grupo 1: $48,50\%$; grupo 2: $61,12\%$ e grupo 3: $61,87\%$. A análise macroscópica demonstrou, portanto, efeitos benéficos nos grupos 2 e 3, sendo significativamente maior no grupo 3. Na análise histológica, as áreas irradiadas apresentaram um aumento na proliferação de capilares e fibroblastos em relação ao grupo controle. O grupo 3 obteve um aumento significativo no número de vasos sanguíneos comparado ao grupo 2. Os autores ressaltaram que o aumento da área de tecido viável nos grupos submetidos à radiação *laser* poderia ser considerado como resultado de vários mecanismos, especialmente pela neovascularização, porém, o mecanismo exato necessitaria de investigações futuras.

Em um outro estudo, Kubota (2002), avaliou os efeitos do laser de diodo (As-Ga-Al, 830nm) no fluxo sanguíneo e na viabilidade de retalhos cutâneos axiais de base caudal ($3 \times 9\text{cm}$) em ratos. Os retalhos foram elevados em todos os animais ($n = 40$) e o fluxo sanguíneo foi mensurado pelo sistema de fluxometria por *laser* Doppler. Os ratos foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais cada. O grupo 1 não foi irradiado, sendo utilizado como controle; no grupo 2, os animais foram irradiados em um único ponto localizado sobre a artéria iliolumbar (principal vaso de irrigação do retalho); no grupo 3, a irradiação ocorreu no ponto médio da porção proximal do retalho e no grupo 4, no ponto médio da porção distal do retalho. Utilizou-se nesse estudo um *laser* com 100mW de potência, modo de emissão contínuo, área da secção transversal do feixe de $0,0054\text{cm}^2$, fluência de $185\text{J}/\text{cm}^2$ e tempo de irradiação de 10 segundos por ponto. O fluxo

sangüíneo foi avaliado durante a irradiação do *laser* de diodo e novamente no 5° e 10° minutos após a irradiação. Em seguida, os retalhos foram suturados nas suas posições de origem. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, porém o *laser* permaneceu desligado. A área de viabilidade dos retalhos foi avaliada no 5° dia pós-operatório.

O sistema de fluxometria por *laser* Doppler demonstrou um aumento significativo no fluxo sangüíneo no 5° e 10° minutos pós-irradiação nos grupos experimentais comparado com o grupo controle. No 5° dia pós-irradiação, houve um aumento significativo na área de viabilidade dos retalhos de todos os grupos experimentais (grupo 2: 92,22%; grupo 3: 91,11%; grupo 4: 88,88%) comparados com o grupo controle (75,55%), porém, não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Segundo o autor, o aumento no fluxo sangüíneo e na área de viabilidade dos retalhos seria devido a um possível mecanismo de modulação do sistema nervoso autônomo.

Pinfildi *et al.* (2005) verificaram a eficácia do *laser* de He-Ne (632,8nm, com 10mW de potência, emissão em modo contínuo, área da secção transversal do feixe de $0,1\text{cm}^2$ e fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Foram utilizados 48 ratos, distribuídos em 4 grupos de 12 animais cada. O retalho cutâneo randômico, de base cranial, foi realizado com as medidas de 10 X 4cm, com uma barreira plástica interposta entre o retalho e o leito doador. O grupo 1 (controle) foi submetido à simulação da irradiação laser de He-Ne. O grupo 2 foi submetido à irradiação, utilizando-se a técnica de aplicação pontual em contato, em 27 pontos localizados sobre o retalho. O grupo 3, em 27 pontos ao redor do retalho e o grupo 4 em 54 pontos, sobre e ao redor do retalho. Os grupos experimentais foram submetidos à irradiação *laser* imediatamente após a operação e nos 4 dias subseqüentes.

As porcentagens da área de necrose de todos os grupos foram avaliadas no 7º dia pós-operatório pelo método do gabarito de papel. O grupo 1 obteve média de área de necrose de 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 significativos em comparação ao grupo controle, e que o grupo 4 apresentou a menor área de necrose comparado a todos os grupos desse estudo. Os autores concluíram que a irradiação *laser* de He-Ne foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, sendo a técnica pontual em contato sobre e ao redor do retalho a mais eficaz comparada aos outros locais de aplicação.

Prado *et al.* (2005) estudaram os efeitos do *laser* de diodo (As-Ga-Al, 830nm, potência de 30mW, emissão em modo contínuo e área da secção transversal do feixe de 0,07cm²) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. Quarenta e oito ratos foram distribuídos em 4 grupos de 12 animais. Na seqüência realizou-se o retalho cutâneo randômico (10 X 4cm), de base cranial, com uma barreira plástica interposta entre o mesmo e o leito doador. O grupo 1 (controle) foi submetido à simulação da irradiação *laser* no pós-operatório imediato e nos 4 dias seguintes, porém o aparelho permaneceu desligado. O grupo 2 recebeu a irradiação *laser* nos 5 dias pré-operatórios, e imediatamente após a última irradiação (quinto dia) foi realizado o retalho cutâneo. O grupo 3 foi submetido à irradiação *laser* no pós-operatório imediato e nos 4 dias seguintes e o grupo 4 recebeu a irradiação nos 5 dias pré-operatórios, no pós-operatório imediato e nos 4 dias seguintes. A fluência utilizada foi de 36J/cm² e a peça de mão do equipamento foi colocada em contato com o retalho cutâneo em um ponto localizado a 2,5cm da base cranial do retalho.

A porcentagem de área necrótica de todos os grupos foi calculada no 7º dia pós-operatório pelo método do gabarito de papel. A média do grupo 1 foi de 48,86%; grupo 2: 36,48; grupo 3: 23,14% e grupo 4: 31,08%. Os resultados mostraram que o *laser* de diodo nesses parâmetros foi eficiente no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, sendo que a aplicação no período pós-operatório (grupo 3) apresentou o melhor resultado comparado aos outros grupos.

Assis *et al.* (2005) realizaram um estudo para comparar a eficácia do *laser* de diodo, com dois comprimentos de onda e operando em duas potências diferentes, na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Utilizou-se o *laser* de diodo com comprimento de onda de 904nm (As-Ga, com potência de 15mW) e o outro de 670nm (Al-Ga-In-P, com potência de 30mW). Foram utilizados 36 ratos, divididos em 3 grupos com 12 ratos em cada. O retalho cutâneo randômico foi realizado com as medidas de 10 X 4cm, apresentava base cranial e uma barreira plástica foi interposta entre o retalho e o leito doador. O grupo 1 (controle) foi submetido à simulação da irradiação. O grupo 2 recebeu a irradiação com o *laser* de 904nm e o grupo 3, com o *laser* de 670nm. Para as irradiações, empregou-se a técnica pontual em contato em um ponto localizado a 2,5cm da base cranial do retalho, imediatamente após a operação e nos 4 dias subsequentes e a fluência utilizada foi de 16J/cm².

A porcentagem da área de necrose dos 3 grupos foi calculada no 7º dia pós-operatório pelo método do gabarito de papel. O grupo 1 obteve média de área de necrose de 48%; o grupo 2: 37% e o grupo 3: 27%. Os resultados mostraram que os 2 grupos irradiados obtiveram valores estatisticamente significativos comparados ao grupo controle. O grupo 3 apresentou o melhor resultado comparado aos demais grupos desse estudo. Dessa forma, os autores concluíram que a irradiação *laser* foi eficiente no aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em

ratos e que o laser com comprimento de onda de 670nm, operando com potência de 30mW, foi mais eficiente do que o de 904nm, com potência de 15mW.

Baldan (2005) estudou a ação do *laser*, com comprimento de onda de 670nm, na viabilidade do retalho cutâneo randômico (10 X 4cm), de base cranial, em ratos. Quarenta ratos foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais. No grupo 1 (controle) ocorreu a simulação da irradiação *laser*. No grupo 2, o retalho cutâneo randômico foi submetido à irradiação *laser* com fluência de $2,14\text{J}/\text{cm}^2$, durante 2 segundos. No grupo 3, a fluência era de $5,36\text{J}/\text{cm}^2$, durante 5 segundos e no grupo 4, era de $20,36\text{J}/\text{cm}^2$, durante 19 segundos. O equipamento emissor de *laser* operava com potência de 30mW, em modo contínuo e área da secção transversal do feixe de $0,028\text{cm}^2$. Todos os animais submetidos à irradiação *laser* foram tratados no pós-operatório imediato e nos 2 dias seguintes, utilizando a técnica pontual em contato em 12 pontos distribuídos na porção cranial do retalho.

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi verificada no 7º dia após a técnica operatória por meio do gabarito de papel. O grupo 1 apresentou média de área de necrose de 49,35%; o grupo 2: 39,14%; o grupo 3: 47,01% e o grupo 4: 29,17%. A análise estatística demonstrou diferença significativa apenas quando comparou-se o grupo 4 com o grupo 1. Entre os grupos 1, 2 e 3 essa diferença não ocorreu. Segundo o autor, o *laser* com comprimento de onda de 670nm, quando irradiado com fluência de $20,36\text{J}/\text{cm}^2$, foi eficaz no aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus*, *Rodentia, Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e massa corporal variando de 280 a 320 gramas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (APÊNDICE A).

Os animais procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Permaneceram individualmente em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22° - 27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, Parecer 003/2006 (APÊNDICE B).

4.2 Equipamento Emissor da Radiação *Laser*

Utilizou-se um *laser* de diodo com meio ativo composto por Al-Ga-In-P (alumínio-gálio-índio-fósforo), da marca Ibramed (Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda[®]), com

comprimento de onda de 670nm, potência óptica de saída de 30mW, área da secção transversal do feixe de 0,06cm² e emissão em modo contínuo (figura 2).

Inicialmente o equipamento foi calibrado e após o procedimento experimental foi novamente aferido no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão *laser*.

Figura 2 – Equipamento emissor da radiação *laser* (Ibramed - Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos Ltda[®]).

4.3 Delineamento Experimental

Os 100 ratos utilizados nesta pesquisa foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, em 5 grupos de 20 animais para a realização dos retalhos cutâneos randômicos.

Grupo 1 (G 1) – Controle: os animais deste grupo foram submetidos à simulação da radiação *laser* em 24 pontos, por um tempo de 48 segundos por ponto. A simulação da aplicação do *laser* ocorreu imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia, sempre com o equipamento desligado.

Grupo 2 (G 2): os animais deste grupo foram submetidos à radiação *laser* ($\lambda = 670\text{nm}$), com fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$, por 6 segundos, fornecendo $0,18\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, sendo assim depositada uma energia total de $4,32\text{J}$, imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia.

Grupo 3 (G 3): os animais deste grupo foram submetidos à radiação *laser* ($\lambda = 670\text{nm}$), com fluência de $6\text{J}/\text{cm}^2$, por 12 segundos, fornecendo $0,36\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, sendo assim depositada uma energia total de $8,64\text{J}$, imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia.

Grupo 4 (G 4): os animais deste grupo foram submetidos à radiação *laser* ($\lambda = 670\text{nm}$), com fluência de $12\text{J}/\text{cm}^2$, por 24 segundos, fornecendo $0,72\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, sendo assim depositada uma energia total de $17,28\text{J}$, imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia.

Grupo 5 (G 5): os animais deste grupo foram submetidos à radiação *laser* ($\lambda = 670\text{nm}$), com fluência de $24\text{J}/\text{cm}^2$, por 48 segundos, fornecendo $1,44\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, sendo assim depositada uma energia total de $34,56\text{J}$, imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em uma única aplicação ao dia.

Em todos os grupos a aplicação do *laser* foi realizada em 24 pontos, distribuídos sobre e ao redor do retalho cutâneo de base cranial. Esses pontos de irradiação foram dispostos a 1cm da margem do retalho e a 2cm entre si (figura 3).

Figura 3 – Esquema ilustrativo da demarcação dos pontos de aplicação da radiação *laser*.

4.4 Técnica Operatória

Os animais foram pesados e, em seguida, anestesiados proporcionalmente à massa corporal, com uma associação de ketamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando-se uma seringa de insulina. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos quatro membros e realizou-se a tricotomia digital no dorso dos mesmos.

Na sequência, o retalho cutâneo randômico de base cranial, com dimensões de 10cm de comprimento e 4cm de largura, foi delineado por meio de um molde plástico recortado nas

medidas padrão, respeitando-se como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, seguindo o modelo experimental proposto inicialmente por McFarlane, DeYoung, Henry (1965) e utilizado em vários outros estudos, como por Liebano, Ferreira, Sabino Neto (2002); Esteves Junior, Ferreira, Liebano (2004); Pinfildi *et al.* (2005) (figura 4).

Figura 4 – Retalho planejado (10 X 4cm).

Os retalhos foram elevados do dorso dos animais a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo a fáscia superficial, panículo carnoso, tecido areolar e pele (McFARLANE; DeYOUNG; HENRY, 1965) (figura 5).

Figura 5 – Retalho cutâneo randômico de base cranial elevado.

Uma barreira plástica (filme F1), com as mesmas dimensões do retalho (10 X 4cm), foi interposta entre o mesmo e o leito doador, impedindo a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito (KORLOF; UGLAND, 1966; KAUFMAN *et al.*, 1985) (figura 6).

Figura 6 – Posicionamento da barreira plástica (10 X 4cm) entre o retalho e o leito doador.

Em seguida, a sutura foi realizada com pontos simples, utilizando-se fio de náilon monofilamentar 4-0, com distância de 1cm entre os pontos, retornando o retalho à mesma posição de origem (DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002) (figura 7).

Figura 7 – Retalho suturado após a interposição da barreira plástica.

Imediatamente após o procedimento operatório, os animais do Grupo 1 permaneceram anestesiados por 30 minutos e foram submetidos à simulação da radiação *laser* (o equipamento permaneceu desligado).

Os animais dos Grupos 2, 3, 4 e 5 também permaneceram anestesiados por 30 minutos e receberam a irradiação *laser* com comprimento de onda de 670nm, com fluência de 3J/cm², 6J/cm², 12J/cm² e 24J/cm², respectivamente.

Todos os animais submetidos à irradiação *laser* foram tratados imediatamente após a operação e nos 4 dias subsequentes, em uma única aplicação ao dia.

Para a padronização dos pontos de aplicação do *laser*, foi confeccionado um molde plástico, que era posicionado sobre o retalho, tendo como referência a região cranial e as margens laterais do mesmo, garantindo que a irradiação *laser* sempre se daria nos mesmos pontos (figura 8).

Nas aplicações, utilizou-se a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao retalho cutâneo e as irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário (PINFILDI *et al.*, 2005).

Figura 8 – Técnica de aplicação pontual em contato com utilização do molde plástico.

4.5 Método de Determinação de Porcentagem da Área de Necrose dos Retalhos

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi avaliada no sétimo dia pós-operatório, 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 em papel vegetal (figura 9), onde se delimitou a área necrosada da área viável do retalho (figura 10). Logo após, o molde de papel vegetal

correspondente ao retalho foi recortado e, a seguir, aferido em uma balança de precisão (erro de $\pm 0,0001\text{g}$).

Figura 9 – Molde de todo o retalho demarcado em papel vegetal.

Figura 10 – Molde de todo o retalho com delimitação entre a área necrosada e a área viável.

Do mesmo fragmento de papel vegetal, recortou-se a área correspondente à necrose do retalho que também foi aferida. Em seguida, foi aplicada a seguinte fórmula:

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

4.6 Coleta da Amostra do Retalho Cutâneo

No sétimo dia pós-operatório, foi realizada a coleta de uma amostra do retalho cutâneo em 10 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, e, em seguida, foram confeccionadas lâminas histológicas para a realização da contagem dos vasos sanguíneos.

Com a finalidade de padronizar a coleta da amostra do retalho, utilizou-se um paquímetro e, dessa forma, estabeleceu-se 2cm de largura a partir da base cranial do retalho, adotando como referência o início da margem direita do mesmo. O comprimento foi determinado pela extensão longitudinal de tecido viável do retalho, acrescido de 1cm de tecido necrosado mensurado a partir da linha de transição entre o tecido viável e o necrótico.

Na figura a seguir, a linha amarela tracejada representa a amostra do retalho cutâneo coletado (figura 11).

Figura 11 – Representação da amostra do retalho cutâneo coletado para a realização das lâminas histológicas.

4.7 Eutanásia dos Animais

Depois de realizada a avaliação da porcentagem da área de necrose e da coleta da amostra do retalho cutâneo, os animais, ainda anestesiados, foram mortos com uma dose letal de cloreto de potássio (KCl), injetado por via intracardíaca.

4.8 Preparação das Amostras

Após a coleta, as peças permaneceram em solução de formaldeído a 10% para fixação, durante 24 horas. Depois disso, foram lavadas em água corrente também por 24 horas. Na seqüência, passaram por desidratação em soluções crescentes de álcool etílico a 70%, 90% e 100%. As peças foram mantidas imersas por 1 hora tanto na primeira como na segunda solução; na última, o procedimento foi repetido por 6 vezes com duração de 1 hora cada. Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro. A duração de cada banho foi de 1 hora.

Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortadas com espessura padronizada de 6µm, por meio de um micrótomo rotativo, Spencer - 820, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Universidade Estadual Paulista), campus de Araraquara. Os cortes foram montados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina (HE).

4.9 Contagem dos Vasos Sangüíneos

Foram confeccionadas lâminas de toda a extensão da amostra do retalho coletado e, para a contagem, foram considerados todos os vasos sangüíneos presentes nessa amostra.

As lâminas foram analisadas por meio de um vídeo microscópio de luz comum da marca ZEISS[®], com monitor da marca SONY[®], localizado no Laboratório de Plasticidade Muscular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar.

As demarcações de cada campo foram estabelecidas de acordo com estruturas que foram visualizadas e introduzidas de forma seqüencial (como novos campos) de acordo com o tamanho do monitor (14 polegadas) e com aumento de 40X no microscópio.

A identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva de modo que não houvesse um conhecimento prévio sobre qual grupo estava sendo analisado, evitando-se, portanto, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos. Ao término da análise, a fita era retirada e o resultado anotado no respectivo grupo.

4.10 Análise Estatística

Os dados foram apresentados por meio de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de médias, medianas e desvios-padrão. Além disso, foi apresentada a porcentagem mínima e máxima da área de necrose e também o número mínimo e máximo de vasos sangüíneos encontrados em cada grupo.

Para verificar a possibilidade de diferenças quanto à porcentagem de necrose e número de vasos dos grupos deste estudo, foram utilizados testes de análise de variância (ANOVA) (APÊNDICES C e D). Em seguida, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais comparações intergrupos apresentaram diferenças estatísticas.

Para investigar a existência de correlação entre os dados obtidos na avaliação da área de necrose com a análise da contagem dos vasos, foi realizado o teste de correlação linear de Pearson (APÊNDICE E).

Com a finalidade de verificar a homogeneidade dos grupos em relação à massa corporal dos animais experimentais, também foi utilizada a ANOVA (APÊNDICE A).

Para todos os testes estatísticos realizados considerou-se um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Porcentagem da Área de Necrose

Os resultados obtidos após a aplicação dos dados na fórmula da porcentagem da área de necrose do retalho foram organizados na tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagem da área de necrose dos retalhos no sétimo dia pós-operatório.

Animal	G1	G2	G3	G4	G5
01	45,73	44,32	37,25	31,51	22,18
02	49,07	51,16	41,21	28,89	14,20
03	48,23	45,02	33,10	38,08	11,45
04	50,27	34,10	30,91	29,37	20,23
05	45,32	42,00	27,45	35,41	12,74
06	56,35	47,68	42,81	22,90	21,57
07	41,15	40,05	53,20	17,43	23,62
08	58,18	35,14	36,59	31,40	28,25
09	66,12	40,71	27,36	29,23	20,59
10	49,28	54,47	36,80	18,97	15,33
11	52,17	40,86	45,38	30,55	21,97
12	61,43	32,53	36,58	32,11	24,05
13	46,85	41,33	34,90	17,85	15,63
14	40,70	36,75	28,72	28,65	17,52
15	51,82	53,60	31,23	46,02	20,95
16	49,88	46,09	36,11	33,76	30,14
17	53,14	37,83	25,62	35,28	27,26
18	42,65	40,52	51,04	24,14	13,01
19	47,06	33,15	45,85	29,62	21,82
20	43,05	39,56	28,14	27,93	24,98
Média	49,92	41,84	36,51	29,45	20,37

G 1 – Grupo 1 (Controle) / **G 2** – Grupo 2 (3J/cm²) / **G 3** – Grupo 3 (6J/cm²) / **G 4** – Grupo 4 (12J/cm²) / **G 5** – Grupo 5 (24J/cm²)

Os dados da análise descritiva são apresentados na tabela 2 e o desenho esquemático da distribuição da porcentagem de necrose dos retalhos por grupo está representado na figura 12.

Tabela 2 – Dados descritivos da porcentagem de necrose dos retalhos nos diferentes grupos estudados.

Grupos	% Média	% Mediana	% Mínima de Necrose	% Máxima de Necrose	Desvio Padrão da %
G1 (Controle)	49,92	49,18	40,70	66,12	6,67
G2 (3J/cm²)	41,84	40,78	32,53	54,47	6,39
G3 (6J/cm²)	36,51	36,35	25,62	53,20	7,97
G4 (12J/cm²)	29,45	29,50	17,43	46,02	6,95
G5 (24J/cm²)	20,37	21,36	11,45	30,14	5,36

Figura 12 – Desenho esquemático da distribuição da porcentagem de necrose dos retalhos por grupo (G1 – Controle; G2 – 3J/cm²; G3 – 6J/cm²; G4 – 12J/cm²; G5 – 24J/cm²), onde os pontos vermelhos indicam a média da porcentagem de necrose, a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana e os asteriscos indicam a presença de pontos atípicos.

No desenho esquemático apresentado na figura 12, foram detectados dois pontos atípicos (representados pelos asteriscos), sendo um deles no grupo 1 (Controle) e um outro no grupo 4 (12J/cm²).

Nesse caso, os pontos atípicos indicam que em cada um dos grupos (G1 e G4), houve um animal que apresentou o valor da porcentagem da área de necrose muito maior que os demais valores do grupo. Porém, como se utilizou nesta pesquisa uma amostra de 100 animais, esses dois valores encontrados não comprometeram a análise estatística.

A análise de variância (ANOVA) indicou diferenças entre as médias de porcentagens de necrose dos grupos ao nível de significância de 5% ($p=0,0001$). Em seguida, foi feito o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais comparações intergrupos apresentaram diferenças estatísticas. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Grupos Comparados			Valor de p
G1 (Controle)	X	G2 (3J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G3 (6J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G2 (3J/cm ²)	X	G3 (6J/cm ²)	$p > 0,05$ ns
G2 (3J/cm ²)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G2 (3J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G3 (6J/cm ²)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,05$ *
G3 (6J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G4 (12J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **

** = altamente significativo / * = significativo / ns = não significativo

Os resultados apresentados na tabela 3 permitem afirmar que:

- Todos os grupos experimentais (G2, G3, G4 e G5) foram diferentes do Controle (G1) quanto à porcentagem de necrose ($p < 0,01$).
- Os grupos G2 e G3 não apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à porcentagem de necrose ($p > 0,05$).
- Os grupos G3 e G4 apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à porcentagem de necrose ($p < 0,05$).
- O grupo G5 apresentou porcentagem de área de necrose inferior a todos os outros grupos (G1, G2, G3 e G4), havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

5.2 Contagem dos Vasos Sangüíneos

Os dados obtidos na contagem de vasos da amostra dos retalhos, nos 10 animais avaliados em cada grupo, foram organizados na tabela 4.

Tabela 4 – Número de vasos sanguíneos da amostra dos retalhos nos animais avaliados.

Animal	G1	G2	G3	G4	G5
01	-	85	95	-	-
02	59	-	90	-	-
03	-	82	112	99	-
04	56	105	-	-	175
05	-	-	-	108	197
06	-	76	88	153	163
07	76	-	-	-	-
08	-	-	104	-	148
09	45	-	-	136	173
10	61	-	100	161	-
11	-	90	-	129	159
12	-	114	-	125	-
13	67	88	-	-	184
14	81	96	127	-	-
15	-	-	119	-	168
16	65	81	-	121	-
17	-	-	135	113	-
18	72	-	-	-	191
19	-	109	85	-	-
20	70	-	-	142	152
Média	65,2	92,6	105,5	128,7	171,0

G1 – Controle / **G2** – 3J/cm² / **G3** – 6J/cm² / **G4** – 12J/cm² / **G5** – 24J/cm²

Os dados da análise descritiva são apresentados na tabela 5 e o desenho esquemático da distribuição de vasos sanguíneos dos retalhos por grupo está representado na figura 13.

Tabela 5 – Dados descritivos da contagem de vasos sanguíneos nos diferentes grupos estudados.

Grupos	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
G1 (Controle)	65,2	66,0	45	81	10,48
G2 (3J/cm²)	92,6	89,0	76	114	12,91
G3 (6J/cm²)	105,5	102,0	85	135	17,21
G4 (12J/cm²)	128,7	127,0	99	161	19,70
G5 (24J/cm²)	171,0	170,5	148	197	16,23

Figura 13 – Desenho esquemático da distribuição de vasos sanguíneos dos retalhos por grupo (G1 – Controle; G2 – 3J/cm²; G3 – 6J/cm²; G4 – 12J/cm²; G5 – 24J/cm²), onde os pontos vermelhos indicam a média de vasos sanguíneos e a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana.

A figura 14 (A e B) ilustra a região do retalho cutâneo localizada próxima à linha de transição entre o tecido viável e o necrótico, de animais de grupos distintos. Em A, está representada a região do retalho de um animal do grupo controle e, em B, a mesma região, porém, de um animal do grupo submetido à irradiação *laser* com fluência de 24J/cm². Nota-se uma maior quantidade de vasos sanguíneos no grupo irradiado com fluência de 24J/cm² em relação ao controle.

Figura 14 A e B – Fotomicrografias representativas de retalhos cutâneos mostrando os vasos sanguíneos (indicados pelas setas) na região próxima à linha de transição entre o tecido viável e o necrótico. **A:** grupo controle. **B:** grupo submetido à irradiação *laser* com fluência de 24J/cm². Coloração HE. (barra = 100µm)

A ANOVA indicou diferenças entre as médias de vasos sangüíneos dos grupos ao nível de significância de 5% ($p=0,0001$). Em seguida, foi feito o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais comparações intergrupos apresentaram diferenças estatísticas. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Grupos Comparados			Valor de p
G1 (Controle)	X	G2 (3J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G3 (6J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G1 (Controle)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G2 (3J/cm ²)	X	G3 (6J/cm ²)	$p > 0,05$ ns
G2 (3J/cm ²)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G2 (3J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G3 (6J/cm ²)	X	G4 (12J/cm ²)	$p < 0,05$ *
G3 (6J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **
G4 (12J/cm ²)	X	G5 (24J/cm ²)	$p < 0,01$ **

** = altamente significativo / * = significativo / ns = não significativo

Os resultados obtidos no teste de comparações múltiplas de Tukey, mostrados na tabela 6, demonstram que os valores de p para os dados da contagem de vasos apresentam o mesmo comportamento em relação à significância estatística, quando comparados com os resultados encontrados na análise da porcentagem de necrose dos retalhos (tabela 3).

O teste de correlação linear de Pearson entre a porcentagem de necrose e o número de vasos sangüíneos apresentou coeficiente de correlação de -0,972 ($p=0,0001$). Portanto, neste caso, as variáveis envolvidas são negativa e fortemente correlacionadas, isto é, quanto menor a

porcentagem da área de necrose, maior foi a quantidade de vasos sanguíneos encontrados no retalho.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O *laser* de baixa intensidade vem sendo cada vez mais estudado em laboratórios e na prática terapêutica, constituindo-se atualmente, em uma das modalidades bioestimulantes mais utilizadas na reabilitação, o que tem contribuído para o melhor entendimento de seus princípios e aplicabilidades. No entanto, as evidências científicas e clínicas ainda são escassas e na maioria das vezes contraditórias, fato este que justifica a necessidade e a relevância da realização de pesquisas envolvendo esse recurso terapêutico (ORTIZ *et al.*, 2001).

Inicialmente, a laserterapia foi utilizada com o objetivo de acelerar o processo cicatricial de úlceras de várias etiologias. Nesse sentido, diversos estudos foram realizados evidenciando possíveis mecanismos de ação do *laser*, tais como: indução da angiogênese, aumento do fluxo sanguíneo, da síntese de colágeno e da proliferação de fibroblastos (KANA *et al.*, 1981; MESTER E; MESTER AE; MESTER A, 1985; WEBB; DYSON; LEWIS, 1998; BISHT *et al.*, 1999; SCHINDL *et al.*, 2000; REDDY, 2003).

Alguns pesquisadores, baseados no princípio da radiação *laser* possuir a capacidade de promover a angiogênese e o aumento do fluxo sanguíneo, também começaram a investigar a ação desse agente terapêutico na viabilidade dos retalhos cutâneos (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA; OHSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005).

Neste estudo utilizou-se o rato como animal de experimentação, devido à maior facilidade de obtenção, manuseio laboratorial, baixo custo e, além disso, pelo fato de existir na literatura um grande número de trabalhos com este modelo animal, possibilitando as comparações entre os resultados obtidos (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA; OHSHIRO, 1996; KUBOTA, 2002; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005).

A pele do rato difere da pele humana principalmente pelas características do tecido profundo da derme. No rato, o panículo carnoso (camada muscular) é aderente à derme, mas ligado à fáscia profunda apenas pelo tecido areolar frouxo. No homem, o panículo adiposo (tela subcutânea superficial) é mais firmemente ligado à fáscia profunda. Em relação ao suprimento sangüíneo para a pele, essas camadas são comparáveis, pois os principais vasos sangüíneos associam-se às mesmas. Assim, tanto no rato quanto no homem, um retalho pediculado deve possuir o panículo para conter os vasos sangüíneos necessários à sua sobrevivência (McFARLANE; DeYOUNG; HENRY, 1965).

Para estudar a necrose e sua prevenção, utilizou-se como modelo experimental o retalho cutâneo randômico dorsal, de base cranial, proposto por McFarlane, DeYoung e Henry (1965). Nesse modelo, o retalho com dimensões de 10cm de comprimento e 4cm de largura, geralmente apresenta porcentagem de necrose entre 25% a 50% a partir de sua porção distal, apesar de que em 5,7% dos casos não ocorre necrose significativa.

Com a finalidade de se obterem condições homogêneas de isquemia e necrose, foi interposta uma barreira plástica (filme F1) entre o retalho e seu leito doador, para impedir a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito, conforme descrito por Korlof e Ugland (1966) e utilizado em vários outros estudos (KAUFMAN *et al.*, 1985; DUARTE; GOMES; FERREIRA, 1998; LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; BALDAN, 2005).

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi avaliada no sétimo dia pós-operatório por meio do método do gabarito de papel, proposto inicialmente por Sasaki e Pang (1980). Além da fácil aplicabilidade e rapidez no modo de avaliação, este método apresenta uma pequena margem de erro (<5%) (SASAKI; PANG, 1980), sendo amplamente utilizado na literatura

(ESTEVEES JUNIOR; FERREIRA; LIEBANO, 2004; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005).

A avaliação da área de necrose dos retalhos ocorreu no sétimo dia pós-operatório, pois de acordo com McFarlane, DeYoung e Henry (1965), nesse momento já era possível encontrar uma delimitação bem evidente entre o tecido viável e o tecido necrótico. A área viável do retalho era caracterizada por pele macia, rósea, quente e com pêlos, enquanto que a área de tecido necrótico apresentava pele rígida, escurecida, fria e com ausência de pêlos (SASAKI; PANG, 1980). Adotou-se o cálculo da área de necrose e não da área de tecido viável, visando possíveis comparações com outros trabalhos mais recentes que também optaram por este procedimento (LIEBANO; FERREIRA; SABINO NETO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005; BALDAN, 2005).

Além disso, no sétimo dia pós-operatório foi realizada a coleta de uma amostra do retalho cutâneo com o objetivo de quantificar os vasos sangüíneos presentes nas amostras dos diferentes grupos estudados e dessa forma, fornecer dados adicionais a respeito da viabilidade dos retalhos.

Para a coleta da amostra, estabeleceu-se 2cm de largura a partir da base cranial do retalho e o comprimento foi determinado pela extensão longitudinal de tecido viável, acrescido de 1cm de tecido necrosado, mensurado a partir da linha de transição entre o tecido viável e o necrótico. Optou-se por essa padronização da coleta com o propósito de realizar a contagem dos vasos da amostra, conforme a área de viabilidade dos retalhos nos diferentes grupos.

Inicialmente foi feito um planejamento estatístico para determinar o número de animais de cada grupo deste trabalho. Para a avaliação das porcentagens de necrose, utilizou-se 20 animais por grupo, devido à grande variabilidade na extensão da área de necrose dos retalhos em um mesmo grupo. No delineamento da análise de contagem dos vasos, foram escolhidos

aleatoriamente 10 animais de cada grupo, levando-se em consideração o grande número de lâminas confeccionadas a partir da amostra coletada em cada retalho.

Neste estudo, os valores de porcentagem de área de necrose do grupo 1 (controle) variaram entre 40,70% a 66,12%, com média de 49,92%. No grupo 2, em que os animais foram submetidos à irradiação *laser* com fluência de 3J/cm², as áreas de necrose variaram entre 32,53% a 54,47%, com média de 41,84%. No grupo 3, em que os animais foram submetidos à irradiação *laser* com fluência de 6J/cm², os valores variaram entre 25,62% a 53,20%, obtendo-se média de 36,51%. No grupo 4, os animais foram irradiados com fluência de 12J/cm², sendo que as áreas de necrose variaram entre 17,43% a 46,02%, com média de 29,45% e no grupo 5, em que os animais foram irradiados com fluência de 24J/cm², os valores variaram entre 11,45% a 30,14%, obtendo-se média de 20,37%.

A análise estatística demonstrou que todos os grupos experimentais apresentaram resultados estatisticamente significativos em comparação ao grupo controle. Na comparação entre os grupos experimentais, o grupo que obteve a menor média de área de necrose foi o grupo 5 ($p < 0,01$) em relação aos grupos 2, 3 e 4. No entanto, comparando-se os grupos 2 e 3, não houve diferença estatística significativa.

Os números de vasos do grupo 1 variaram entre 45 a 81, com média de 65, 2; no grupo 2, variaram entre 76 a 114, com média de 92,6; no grupo 3, variaram entre 85 a 135, obtendo-se média de 105,5; no grupo 4, variaram entre 99 a 161, obtendo-se média de 128,7 e finalmente no grupo 5, variaram entre 148 a 197, apresentando média de 171,0.

A análise estatística dos resultados da contagem de vasos demonstrou que todos os grupos experimentais apresentaram resultados estatisticamente significativos em comparação ao grupo controle. Na comparação entre os grupos experimentais, o grupo que obteve a maior média de

vasos foi o grupo 5 ($p<0,01$) em relação aos grupos 2, 3 e 4. Na comparação entre os grupos 2 e 3, não houve diferença estatística significativa.

Deve-se ressaltar que o teste de correlação linear de Pearson entre a porcentagem de necrose e o número de vasos sangüíneos apresentou coeficiente de correlação de $-0,972$ ($p=0,0001$). Portanto, neste caso, as variáveis envolvidas são negativa e fortemente correlacionadas, isto é, quanto menor a porcentagem da área de necrose, maior foi a quantidade de vasos sangüíneos encontrados no retalho.

Os resultados deste estudo mostraram que o *laser* de baixa intensidade, com comprimento de onda de 670nm foi eficaz na redução da área de necrose da porção distal do retalho e no aumento do número de vasos. Observou-se também que à medida que os retalhos cutâneos foram submetidos às irradiações com as fluências 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.

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, BALDAN, 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.

Na tabela 7 são apresentados os principais estudos encontrados na literatura em que os autores avaliaram a ação do *laser* na viabilidade dos retalhos cutâneos. Para a construção da tabela, alguns parâmetros utilizados nas aplicações foram ajustados e, em seguida, calculados com a finalidade de facilitar a comparação entre os trabalhos (tabela 7).

Tabela 7 – Principais estudos com a utilização do *laser* na viabilidade dos retalhos cutâneos.

Estudo	λ	Potência de saída	Área secção transv. feixe	Técnica de aplicação	Fluência	Energia por ponto	Nº de pontos irradiados	Energia total	Total de aplicações	Resultado
Kami <i>et al.</i> , 1985	830nm	15mW	0,02cm ²	pontual (contato)	16J/cm ²	0,3J	18	5,4J	5	positivo
Smith <i>et al.</i> , 1992	632,8nm	2,75mW	0,008cm ²	varredura	0,082J/cm ²	-----	-----	1,15J	10	negativo
Zhang <i>et al.</i> , 1992	10.600 nm	2W	6,67cm ²	pontual	18J/cm ²	120J	3	360J	14	positivo
Kubota; Ohshiro, 1996	830nm	60mW	0,1cm ²	pontual (1cm do tecido)	36J/cm ²	3,6J	1	3,6J	1	positivo
Amir <i>et al.</i> , 2000	632,8nm	6mW	3,14cm ²	pontual (contato)	2,9J/cm ²	1,8J	1 2	1,8J 3,6J	5	positivo
Kubota, 2002	830nm	100mW	0,0054 cm ²	pontual	185J/cm ²	1J	1	1J	1	positivo
Pinfildi <i>et al.</i> , 2005	632,8nm	10mW	0,1cm ²	pontual (contato)	3J/cm ²	0,3J	27 54	8,1J 16,2J	5	positivo
Prado <i>et al.</i> , 2005	830nm	30mW	0,07cm ²	pontual (contato)	36J/cm ²	2,52J	1	2,52J	5 10	positivo
Assis <i>et al.</i> , 2005	670nm 904nm	30mW 15mW	-----	pontual (contato)	16J/cm ²	-----	1	-----	5	positivo
Baldan, 2005	670nm	30mW	0,028cm ²	pontual (contato)	2,14J/cm ² 5,36J/cm ² 20,36J/cm ²	0,06J 0,15J 0,57J	12	0,72J 1,8J 6,84J	3	positivo

Sabe-se que a eficácia da laserterapia é referida como sendo dependente de algumas variáveis, como: comprimento de onda, potência, fluência, área da seção transversal do feixe emissor, energia total emitida, técnica de aplicação e frequência de tratamento (BASFORD, 1995; SCHINDL *et al.*, 2000; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; HIPSHIDZE *et al.*, 2001; REDDY, 2003).

Na tabela 7, observa-se que na literatura pesquisada existem estudos que utilizaram *lasers* com diferentes comprimentos de onda e encontraram resultados significativos no aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos (KAMI *et al.*, 1985; AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2005; BALDAN, 2005).

Apenas dois trabalhos avaliaram a ação do *laser* com comprimento de onda de 670nm na viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em ratos. Assis *et al.* (2005), compararam os *lasers* com comprimentos de onda de 670nm (com potência de 30mW) e 904nm (com potência de 15mW) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos, contudo, foi empregada a mesma fluência (16J/cm²) nos dois tipos de *lasers*. Houve uma diminuição significativa da área de necrose dos grupos irradiados comparados ao grupo controle, no entanto, os resultados demonstraram que o *laser* com comprimento de onda de 670nm, operando com potência de 30mW, foi mais eficaz do que o de 904nm, com potência de 15mW. Baldan (2005) também utilizou o *laser* com comprimento de onda de 670nm com fluências de 2,14J/cm², 5,36J/cm² e 20,36J/cm², encontrando resultados significativos somente com a fluência de 20,36J/cm².

Esses estudos se contradizem em algumas variáveis, tais como, número de pontos irradiados, quantidade de aplicações da radiação *laser* e fluências empregadas. Assis *et al.* (2005) aplicaram a radiação *laser* em um único ponto localizado a 2,5cm da base cranial do retalho durante 5 dias consecutivos. Já no trabalho realizado por Baldan (2005), os retalhos foram

irradiados em 12 pontos distribuídos na porção cranial, durante 3 dias consecutivos, demonstrando resultados importantes, no entanto, as aplicações com fluências de 2,14J/cm² e 5,36/cm² não apresentaram diferenças significativas entre si e comparadas ao grupo controle, o que difere dos estudos de Amir *et al.* (2000) e Pinfildi *et al.* (2005), que encontraram diminuição das áreas de necrose com fluências de 2,9J/cm² e 3 J/cm², respectivamente.

No presente estudo, a aplicação da radiação *laser* ocorreu em 24 pontos, distribuídos sobre e ao redor do retalho, baseando-se no trabalho de Pinfildi *et al.* (2005), que encontraram a menor área de necrose quando se realizou a aplicação do *laser* sobre e ao redor do retalho cutâneo randômico em ratos.

Os grupos experimentais do presente estudo foram irradiados durante 5 dias consecutivos, ou seja, imediatamente após a operação e nos 4 dias seguintes, assim como Pinfildi *et al.* (2005) e Assis *et al.* (2005), que também irradiaram os grupos experimentais durante 5 dias consecutivos. Nos trabalhos realizados por Smith *et al.* (1992) e Kubota; Ohshiro (1996), os retalhos foram avaliados no 5º dia pós-operatório, diferentemente deste estudo, em que a avaliação foi realizada no 7º dia pós-operatório devido aos sinais de necrose do retalho, manifestarem-se entre 3 a 4 dias, chegando ao seu limiar final de necrose entre 7 a 10 dias (McFARLANE; DeYOUNG; HENRY, 1965).

No presente estudo, a técnica de aplicação empregada foi a pontual em contato, conforme realizado nos trabalhos de Kami *et al.* (1985), Amir *et al.* (2000), Pinfildi *et al.* (2005), Assis *et al.* (2005) e Baldan (2005). Segundo alguns autores, a aplicação em contato da fonte *laser* com a superfície da pele durante a irradiação aumenta a profundidade de penetração devido à redução de reflexão e dispersão de energia (GREATHOUSE; CURRIER; GILMORE, 1985; LAAKSO; RICHARDSON, CRAMOND, 1993b; BAXTER, 1997). Outros trabalhos também demonstraram

resultados significativos em relação ao aumento da viabilidade em retalhos e em úlceras, tanto em ratos quanto em seres humanos, utilizando o mesmo tipo de técnica (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KUBOTA; OHSHIRO, 1996; SCHINDL *et al.*, 1999; AMIR *et al.*, 2000; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005).

Em relação às fluências, observa-se na tabela 7, uma grande discrepância entre os trabalhos realizados. Os valores desse parâmetro variam de $0,082\text{J}/\text{cm}^2$ (SMITH *et al.*, 1992) a $185\text{J}/\text{cm}^2$ (KUBOTA, 2002). No presente estudo foram testadas as fluências em um intervalo crescente de $3\text{J}/\text{cm}^2$, $6\text{J}/\text{cm}^2$, $12\text{J}/\text{cm}^2$ e $24\text{J}/\text{cm}^2$, com o objetivo de encontrar uma possível “janela terapêutica” para as aplicações do *laser* na viabilidade dos retalhos cutâneos. Essas fluências foram escolhidas a partir dos estudos de Pinfildi *et al.* (2005) que utilizaram uma fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e Baldan (2005) que estudou as fluências de $2,14\text{J}/\text{cm}^2$, $5,36\text{J}/\text{cm}^2$ e $20,36\text{J}/\text{cm}^2$.

Os resultados dos trabalhos analisados na literatura e também do presente estudo não demonstraram um efeito inibitório do *laser* nas fluências 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 utilizou-se fluências maiores houve um aumento na viabilidade dos retalhos cutâneos. É importante ressaltar ainda que entre os grupos submetidos à irradiação *laser* com fluências de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $6\text{J}/\text{cm}^2$ (grupos 2 e 3, respectivamente) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas em relação ao aumento da viabilidade dos retalhos, possivelmente devido ao fato dessas fluências apresentarem valores muito próximos dentro da “janela terapêutica”.

Diante da discrepância entre as fluências empregadas nos estudos encontrados na literatura, considera-se de extrema relevância a observação de outros parâmetros envolvidos na

aplicação do *laser* com intuito de uma melhor interpretação dos resultados e maior elucidação dos mecanismos de ação desse recurso terapêutico.

Em relação à energia total aplicada em cada sessão de tratamento, nota-se uma grande diversidade nos valores, variando de 1J (Kubota, 2002) a 360J (Zhang *et al.*, 1992), porém, em ambos os trabalhos foram encontrados resultados benéficos da aplicação do *laser* na viabilidade dos retalhos.

Kubota (2002) utilizou o *laser* de As-Ga-Al (830nm) com fluência de 185J/cm², área da secção transversal do feixe de 0,0054cm² e energia total de 1J. Os grupos experimentais foram submetidos à irradiação *laser* com utilização da técnica pontual em pontos estratégicos do retalho. É interessante observar que nesse caso o autor estudou o modelo de retalho axial em ratos e, assim, definiu-se o principal vaso de irrigação desse retalho. A partir disso, os retalhos de um dos grupos experimentais foram submetidos à irradiação em um ponto localizado sobre esse vaso (artéria íliolombar). Nos outros dois grupos experimentais as irradiações ocorreram em um ponto localizado na região proximal dos retalhos e no outro grupo em um ponto na região distal. Houve um aumento significativo na área de viabilidade dos retalhos de todos os grupos experimentais comparados com o grupo controle, porém, não houve diferença significativa entre os grupos irradiados, embora, os retalhos do grupo irradiado diretamente sobre a artéria íliolombar tenham apresentado a maior média de viabilidade entre os grupos estudados.

No entanto, Smith *et al.* (1992) irradiaram retalhos cutâneos randômicos utilizando um *laser* de He-Ne (632,8nm) com fluência de 0,082J/cm², área da secção transversal do feixe de 0,008cm² e energia total de 1,15J e não obtiveram resultados significativos no aumento da viabilidade desses retalhos. Nota-se que em ambos os estudos, os autores empregaram uma energia total semelhante, porém, deve-se considerar que no estudo realizado por Smith *et al.* (1992) os autores utilizaram a técnica de aplicação do *laser* por varredura. Essa técnica favorece

uma maior dispersão da energia emitida, promovendo assim uma redução da energia total absorvida pelo tecido.

Em contrapartida, no estudo de Zhang *et al.* (1992) utilizou-se uma energia total de 360J em cada aplicação e também obteve-se resultados benéficos no aumento da viabilidade dos retalhos. Os autores irradiaram os retalhos com um *laser* de CO₂ (10.600nm) com fluência de 18J/cm², no entanto, o *laser* operava com potência de 2W e apresentava área da secção transversal do feixe de 6,67cm². Observa-se que, mesmo com a utilização de uma energia total bem mais elevada que as empregadas nos estudos encontrados na literatura e com aplicações da irradiação *laser* duas vezes ao dia, houve um aumento importante na média da área de tecido viável do grupo experimental (83,28%) quando comparado ao grupo controle (51,43%), indicando uma possível melhora na perfusão vascular do retalho.

No presente estudo, foram estudadas diferentes fluências do *laser* com comprimento de onda de 670nm, portanto, foram aplicadas diferentes energias totais nos retalhos dos grupos estudados. O grupo 1 foi considerado como controle, sendo submetido apenas à simulação da irradiação *laser*. O grupo 2 (3J/cm²) apresentou energia total de 4,32J; o grupo 3 (6J/cm²), 8,64J; o grupo 4 (12J/cm²), 17,28J e finalmente o grupo 5 (24J/cm²) com energia total de 34,56J. Essas energias correspondem à energia total de cada aplicação diária.

Na tabela 7, nota-se que nos trabalhos de Kami *et al.* (1985) e Pinfildi *et al.* (2005) foram utilizadas energias totais semelhantes às empregadas neste estudo. Kami *et al.* (1985) utilizaram energia total de 5,4J, já Pinfildi *et al.* (2005) trabalharam com energia total de 8,1J em dois de seus grupos experimentais e em um outro grupo utilizou-se uma energia total de 16,2J. Os dois trabalhos demonstraram efeitos benéficos da irradiação *laser*, porém, Pinfildi *et al.* (2005) encontraram melhor resultado na diminuição da área de necrose dos retalhos quando aplicaram

uma energia maior, no caso, 16,2J. No presente estudo, encontrou-se uma melhor resposta da ação do *laser* na viabilidade dos retalhos cutâneos com utilização de uma energia total de 34,56J.

Deve-se ressaltar que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avaliou os efeitos do *laser* de baixa intensidade na viabilidade dos retalhos com essa faixa de energia total (34,56J), exceto no trabalho de Zhang *et al.* (1992), porém, como foi visto anteriormente, os autores investigaram, nesse caso, a ação de um outro tipo de *laser* que na realidade é bem menos utilizado.

No presente estudo, o grupo submetido à irradiação *laser* com fluência de 24J/cm² foi o mais eficaz na viabilidade dos retalhos cutâneos, indicando um possível aumento do fluxo sanguíneo e da neoformação vascular. Na contagem dos vasos sanguíneos, observou-se uma maior quantidade de pequenos vasos nos retalhos desse grupo, o que corrobora os resultados dos trabalhos de Kami *et al.* (1985) e Amir *et al.* (2000) que também encontraram um aumento do número de vasos nos retalhos irradiados.

Existem relatos na literatura de que o *laser* de baixa intensidade tem a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo na microcirculação por aumentar a liberação de óxido nítrico no local irradiado, sendo este um potente vasodilatador (BAXTER, 1997; WILDEN; KARTHEIN, 1998; KITCHEN; BAZIN, 1996). 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, 1998; SCHINDL *et al.*, 1999).

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; HIPPENSTIEL *et al.*, 1998), pode

promover a indução da angiogênese local e favorecer a viabilidade dos retalhos cutâneos (PADUBIDRI; BROWNE, 1996; LI *et al.*, 2000).

Segundo Stadler *et al.* (2000) o *laser* de baixa intensidade também ativa a liberação de SOD (superóxido-dismutase), auxiliando a inibição da ação dos radicais livres. Alguns autores relatam que os radicais livres são importantes mediadores da isquemia, favorecendo a destruição tecidual. Esses radicais podem participar de reações em cadeia e causarem peroxidação das membranas celulares e das proteínas intracelulares, podendo ocasionar lesões celulares irreversíveis (AIKENS; DIX, 1991; ZHANG *et al.*, 2003).

Nota-se que em relação às pesquisas com o *laser* de baixa intensidade há um grande número de estudos na literatura, porém, não há uma padronização dos parâmetros empregados e a falta de dados nos trabalhos encontrados dificulta a comparação de resultados e o entendimento de alguns mecanismos envolvidos em diversos estudos. Dessa forma, são necessárias novas pesquisas com o intuito de verificar a importância e a dependência entre cada um dos parâmetros do *laser*, bem como as possíveis influências exercidas nas respostas biológicas, podendo assim melhorar a especificidade da laserterapia e também a elaboração de protocolos com tratamentos mais seguros e eficazes.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- 1.) O *laser* de baixa intensidade ($\lambda = 670\text{nm}$) foi eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, em todas as fluências utilizadas neste estudo.
- 2.) A fluência de 24J/cm^2 foi a mais eficaz no aumento da viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, quando comparada às outras fluências testadas (3J/cm^2 , 6J/cm^2 e 12J/cm^2).

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AGAIBY, A.D.; GHALI, L.R.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers Surg. Med.**, v. 26, p. 357-63, 2000.

AIKENS, J.; DIX, T.A. Perhydroxyl radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 23, p. 15091-8, 1991.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg. Med.**, v. 29, p. 179-84, 2001.

AMIR, A.; SOLOMON, A.S.; GILER, S.; CORDOBA, M.; HAUBEN, D.J. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 53, p. 58-62, 2000.

ASAI, S.; FUKUTA, K.; TORII, S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. **Ann. Plast. Surg.**, v. 38, n. 5, p. 514-17, 1997.

ASSIS, L.R. de; MARCOLINO, A.; PINFILDI, C.E.; PRADO, R.P. Comparison of the 904 nm and 670 nm diode laser in the viability of random skin flap in rats. **Photomed. Laser Surg.**, New York, v. 23, n. 1, p. 118-19, feb. 2005. Abstract.

BALDAN, C. **Ação do laser vermelho de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos**. São Paulo, 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg. Med.**, v. 9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, J.R. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v. 16, p. 331-42, 1995.

BAXTER, G.D. Bioenergetics and tissue optics. In: **Therapeutic lasers: theory and practice**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

BAXTER, G.D.; BELL, A.J.; ALLEN, J.M.; RAVEY, J. Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-8, 1991.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. **Phys. Ther.**, v. 72, p. 483-91, 1992.

BIONDO-SIMÕES, M. de L.P.; GRECA, F.H.; PAULA, J. B. de; CHIN, E.W.K.; SANTOS, E. A. A. dos; STALHSCHMIDT, F.L. Influência do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos – estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, supl. 3, p. 36-40, 2000.

BISHT, D.; MEHROTRA, R.; SINGH, P.A.; ATRI, S.C.; KUMAR, A. Effect of helium-neon laser on wound healing. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 37, p. 187-9, 1999.

BRAVERMAN, B.; MCCARTHY, R.J.; IVANKOVICH, A.D.; FORDE, D.; Effect of helim-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.**, v. 9, p. 50-8, 1989.

CALDERHEAD, R.G. Introduction to laser therapy: pathways, mechanisms and dosimetry. In: 2nd Congress World Association For Laser Therapy. **Proceedings**, Kansas City, USA, Sep 2-5, 1998, p. 7.

COLLS, J. **La terapia láser hoy**. Barcelona: Edición Centro de Documentación Láser, 1985.

CYMROT, M.; PERCÁRIO, S.; FERREIRA, L.M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. **Acta Cir. Bras.** [serial online] v. 19, n. 1, 2004.

DAVIS, E.R.; WACHHOLZ, J.H.; JASSIR, D.; PERLYN, C.A.; AGRAMA, M.H. Comparison of topical anti-ischemic agents in salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. **Arch. Facial Plast. Surg.**, v. 1, p. 27-32, 1999.

DE BIE, R.A.; DE VET, H.; LENSSEN, T.F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 79, p. 1415-20, 1998.

DUARTE, S.I.; GOMES, H.F.C.; FERREIRA, L.M. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. **Can. J. Plast. Surg.**, v. 6, p. 93-7, 1998.

ESTEVEES JUNIOR, I.; FERREIRA, L.M.; LIEBANO, R.E. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, p. 626-9, 2004.

FERREIRA, L.M. Retalhos Cutâneos. In: FERREIRA, L.M. **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1995. p.45-62.

FLAMME, I.; VON REUTERN, M.; DREXLER, H.C.; SYED-ALI, 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.**, v. 1, n. 2, p. 399-414, 1995.

FREIRE, S.T.; FERREIRA, L.M.; GOMES, H.C.; PERCÁRIO, S. Uric acid as a monitor of oxidative stress in a random skin flap in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, suppl. 6, p. 534-6, 2003.

GHALI, L.; DYSON, M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation. In: STEINER R.; LANGER, R. **Angiogenesis: Key principles-science-technology-medicine**. Basel: Birkhauser Verlag: 1992, p. 411-4.

GHERARDINI, G.; GURLECK, A.; MILNER, S.M.; MATARASSO, A.; EVANS, G.R.; JERNBECK J.; LUNDEBERG, T. Calcitonin gene-related peptide improves skin flap survival and tissue inflammation. **Neuropeptides**, v. 32, n. 3, p. 269-73, 1998.

GHERARDINI, G.; LUNDEBERG, T.; CUI, J.G.; ERIKSSON, S.V.; TRUBEK, S.; LINDEROTH, B. Spinal cord stimulation improves survival in ischemic skin flaps: an experimental study of the possible mediation by calcitonin gene-related peptide. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 103, n. 4, p. 1221-8, 1999.

GOGIA, P.P. Physiology of wound healing. In: **Clinical Wound Management**. 1ª ed. United States of America: SLACK Incorporated, cap. 1, p. 1-12, 1995.

GONZÁLEZ, M.V.; COLLS, J.C. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el láser de baja potencia. **Bol. Centro Documentación Láser**, v. 15-6, p. 6-21, 1988.

GREATHOUSE, D.C.; CURRIER, D.P.; GILMORE, R.L. Effects of clinical infrared laser on superficial radial nerve conduction. **Phys. Ther.**, v. 65, n. 8, p. 1184-7, 1985.

HARRIS, D.M. Biomolecular mechanisms of laser biostimulation. **J. Clin. Laser. Med. Surg.**, p. 277-80, 1991.

HIPPENSTIEL, S.; KRULL, M.; IKEMANN, A.; RISAU, W.; CLAUSS, M.; SUTTROP, N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 5, p. 678-84, 1998.

HONMURA, A.; ISHII, A.; YANESE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg. Med.**, v. 13, p. 463-9, 1993.

IM, M.J.; LEE, W.P.A.; HOOPES, J.E. Effect of electrical stimulation on survival of skin flap in pigs. **Phys. Ther.**, v. 70, n. 1, p. 37-40, 1990.

JANSEN, G.; LUNDEBERG, T.; SAMUELSON, U.E.; THOMAS, M. Increased survival of ischemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. **Acta Physiol. Scand.**, v. 135, p. 555-8, 1989.

JURELL, G.; JONSSON, C.E. Increased survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 10, p. 169-72, 1976.

KAMI, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAJIMA, T.; OHSHIRO, T.; FUJINO, T. Effects of low-power diode lasers on flap survival. **Ann. Plast. Surg.**, v. 14, n. 3, p. 278-83, 1985.

KANA, J.S.; HUTSCHENREITER, G.; HAINA, D.; WAIDELICH, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, v. 116, p. 293-6, 1981.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J. Quant. Electr.**, v. QE-23, n. 10, p. 1703-17, 1987.

KARU, T.I. **Photobiology of low-power laser therapy**. London: Harwood Academic Publishers, 1989.

KARU, T.I.; TIPHLOVA, O.; SAMOKHINA, M.; DIAMANTOPOULOS, C. Effects of near-infrared laser and superluminous diode irradiation on escherichia coli division rate. **IEEE J. Quant. Electr.**, v. 26, p. 2162-5, 1990.

KARU, T.I. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of Effects of Low Power Light on Biological Systems**, v. 2630, p. 2-9, 1995.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v. 27, p. 219-33, 1995.

KARU, T.I. **The science of low-power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KARU, T.I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I.; LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 1-7, 2000.

KAUFMAN, T.; ANGEL, M.F.; EICHENLAUB, E.H.; LEVIN, M.; HURWITZ, D.J.; FUTRELL, J.W. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 14, p. 64-73, 1985.

KERRIGAN, C.L. Skin Flap Failure: Pathophysiology. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 72, p. 766-77, 1983.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M.H.; SHANKAR, L.R.; KHANNA, L.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v. 28, p. 355-64, 2001.

KITCHEN, S.S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Ed. Manole Ltda, p. 191-210, 1996.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of low level laser therapy. **Physioterapy.**, v. 77, n. 3, p. 161-8, 1991.

KJARTANSSON, J.; LUNDEBERG, T. Effects of electrical nerve stimulation (ENS) in ischemic tissue. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v. 24, p. 129-34, 1990.

KLOTH, L. **Wound healing: alternatives in management**. USA: Churchill Livingstone. p. 347-64, 1997.

KORLOF, B.; UGLAND, O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with Complamin and with Dicoumarol: animal experiments. **Acta Chir. Scand.**, v. 131, n. 5, p. 408-12, 1966.

KRAG, C.; TAUDORF, U.; SIIM, E.; BOLUND, S. The effect of pulsed electromagnetic energy (Diapulse) on the survival of experimental skin flaps. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 13, p. 377-80, 1979.

KUBOTA, J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. **Lasers Med. Sci.**, v. 17, p. 146-53, 2002.

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

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Quality of light – is laser necessary for effective photobiostimulation? **Australian J. Physiother.**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 1993a.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian J. Physiother.**, v. 39, n. 2, p. 95-9, 1993b.

LI, Q.F.; REIS, E.D.; ZHANG, W.X.; SILVER, L.; FALLON, J.T.; WEINBERG, H. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 16, n. 1, p. 45-9, 2000.

LIEBANO, R.E.; FERREIRA, L.M.; SABINO NETO, M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. **Can. J. Plast. Surg.**, v. 10, p. 151-4, 2002.

LONGO, L.; MESTER, A. Present and future of laser cicatrization. In: **Proceeding 2nd Congress World Association for Laser Therapy**. Kansas City, Missouri, USA, September 2-5, p. 10-1, 1998.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3ª ed., Barueri-SP: Ed. Manole Ltda, 2001.

MAEGAWA, Y.; ITOH, T.; HOSOKAWA, T.; YAEGASHI, K.; NISHI, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Lasers Surg. Med.**, v. 27, p. 427-37, 2000.

McFARLANE, R.M.; DeYOUNG, G.; HENRY, R.A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 35, n. 2, p. 177-82, 1965.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, v. 5, p. 31-9, 1985.

NIINA, Y.; IKEDA, K.; IWA, M.; SAKITA, M. Effects of electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of musculocutaneous flap in rats. **Am. J. Chin. Med.**, v. 25, p. 273-80, 1997.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application**. Chichester: Ed. John Wiley & Sons, p. 3-10, 1991.

OHSHIRO, T.; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **Keio J. Med.**, v. 42, n. 4, p. 191-5, 1993.

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S. dos; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-40, 2001.

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.**, v. 37, n. 6, p. 604-11, 1996.

PARRISH, J.A.; DEUTSCH, T. Laser photomedicine. **IEEE J. Quant. Electr.**, v. QE-20, n. 12, p. 1386-96, 1984.

PARRISH, J.A.; ROSEN, C.F.; GANGE, R.W. Therapeutic uses of light. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 453, p. 354-64, 1985.

PINFILDI, C.E.; LIEBANO, R.E.; HOCHMAN, B.S.; FERREIRA, L.M. Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. **Lasers Surg. Med.**, v. 37, p. 74-7, 2005.

PRADO, R.P.; PINFILDI, C.E.; LIEBANO, R.E.; HOCHMAN, B.S.; FERREIRA, L.M. Diode laser in viability of random skin flap in rats. **Photomed. Laser Surg.**, New York, v. 23, n. 1, p. 115, Feb. 2005. Abstract.

REDDY, G.K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, p. 344-51, 2003.

RIBEIRO, M.S.; SILVA, D.F.T. da; ARAÚJO, C.E.N. de; OLIVEIRA, S.F. de; PELEGRINI, C.M.R.; ZORN, T.M.T.; ZECELL, D.M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 22, p. 59-66, 2004.

SALMI, A.M.; HONG, C.; FUTRELL, W. Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischaemic preconditioning: an experimental study in rats. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v. 33, p. 163-7, 1999.

SASAKI, G.H.; PANG, C.Y. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 65, p. 152-8, 1980.

SCHAFFER, M.; SROKA, R.; SCHRADER-REICHARDT, U.; SCHAFFER, P.M. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v. 40, p. 253-7, 1997.

SCHANAIDER, A.; OLIVEIRA NETO, A.A. de; COSTA, I.R. da; LEITE, G.L.S.; CONSIDERA, D.P.; LOPES, A.K.P.; SILVA, A.R. Mannitol in reperfusion skin island flaps injury. **Acta Cir. Bras.** [serial online] v. 14, n. 3, 1999.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L.; JURECKA, W.; HÖNIGSMANN, H.; BREIER, F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 40, n. 3, p. 481-4, 1999.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHÖN, SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy: a review. **J. Invest. Med.**, v. 48, n. 5, p. 312-26, 2000.

SIMUNOVIC, Z.; TROBONJACA, T.; TROBONJACA, Z. Treatment of medial and lateral epicondylitis – tennis and golfer's elbow with low level laser therapy: a multicenter double blind, placebo – controlled clinical study on 324 patients. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 16, p. 145-51, 1998.

SMITH, R.J.; BIRNDORF, M.; GLUCK, G.; HAMMOND, D.; MOORE, W.D. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 89, n. 2, p. 306-10, 1992.

SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers Surg. Med.**, v. 25, p. 263-71, 1999.

STADLER, I.; EVANS, R.; KOLB, B.; NAIM, J.; NARAYAN, V.; BUEHNER, N.; LANZAFAME, R.J. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. **Lasers Surg. Med.**, v. 27, p. 255-61, 2000.

TIPHLOVA, O.A.; KARU, T.I. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of *E. coli*. **Microbiol.**, v. 60, p. 626-30, 1987.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background.** Sweden: Prima Books, 1999.

TYNER, T.R.; TONG, W.; DONOVAN, K.; McDONALD, T.; SIAN, K.; YAMAGUCHI, K.T. Dichloroacetate reduces tissue necrosis in a rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 56, n. 3, p. 320-6, 2006.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W.H.P. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers Surg. Med.**, v. 22, p. 294-301, 1998.

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.**, v. 16, n. 3, p. 159-65, 1998.

YU, S.Y.; CHIU, J.H.; YANG, S.D.; HSU, Y.C.; LUI, W.Y.; WU, C.W. Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 22, p. 78-86, 2006.

ZHANG, D.; ZHOU, 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.**, v. 4, p. 75-9, 1992.

ZHANG, F.; OSWALD, T.; LIN, S.; CAI, Z.; LEI, M.; JONES, M.; ANGEL, M.F.; LINEAWEAVER, W.C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 56, n. 7, p. 653-9, 2003.

FONTES CONSULTADAS

MALERBO, M.B.; PELÁ, N.T.R. Apresentação escrita de trabalhos científicos. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003. 98 p.

SANTOS, H.H. Manual prático para elaboração de projetos, monografias, dissertações e teses na área de saúde. 2º ed. João Pessoa: Editora Universitária, 2004. 253 p.

SOARES, J.F.; SIQUEIRA, A.L. Introdução à estatística médica. 2º ed. Belo Horizonte: Editora Segrac, 2001. 300 p.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 8 – Massa corporal dos ratos (em gramas).

Animal	G1	G2	G3	G4	G5
01	295	305	285	300	290
02	300	294	290	300	305
03	288	285	305	285	300
04	302	300	280	295	308
05	295	310	287	290	293
06	305	308	302	320	296
07	300	305	295	285	305
08	285	290	290	295	305
09	305	295	312	300	292
10	310	300	310	320	300
11	306	315	306	315	295
12	290	298	290	285	290
13	290	305	285	290	310
14	300	280	300	305	305
15	305	290	295	300	285
16	295	296	310	285	305
17	305	310	316	295	290
18	307	300	310	305	305
19	285	315	295	300	295
20	300	305	290	315	290
Média	298,40	300,30	297,65	299,25	298,20

G1 – Controle / **G2** – 3J/cm² / **G3** – 6J/cm² / **G4** – 12J/cm² / **G5** – 24J/cm²

Os dados da análise descritiva são apresentados na tabela 9 e o desenho esquemático das distribuições das massas corporais dos ratos por grupo está representado na figura 15.

Tabela 9 – Dados descritivos das massas corporais dos ratos (em gramas).

Grupo	Massa Mínima	Massa Máxima	Média	Mediana	Desvio Padrão
G1 (Controle)	285,00	310,00	298,40	300,00	7,63
G2 (3 J/cm²)	280,00	315,00	300,30	300,00	9,51
G3 (6 J/cm²)	280,00	316,00	297,65	295,00	10,63
G4 (12 J/cm²)	285,00	320,00	299,25	300,00	11,39
G5 (24 J/cm²)	285,00	310,00	298,20	298,00	7,45

Figura 15 – Desenho esquemático das distribuições das massas corporais dos ratos. Os pontos vermelhos representam as médias das massas dos animais por grupo e a linha inserida dentro do retângulo representa a mediana.

Na figura 15, observa-se que os dados, aparentemente, não obedecem às condições de simetria (veja as diferenças nos comprimentos das caudas dos *box-plots* e a linha que divide os retângulos (mediana) nem sempre se apresenta no meio). Também pelos tamanhos dos *box-plots* e dos retângulos parece não haver igualdade de variação entre os grupos. Entretanto, a decisão final quanto a isso somente poderá ser obtida mediante uma análise de resíduos (como será feito a seguir).

Para a realização de uma análise de variância (ANOVA), os dados devem satisfazer certas condições, como: normalidade (distribuições simétricas) e homocedasticidade (igualdade de variâncias entre os grupos). Além disso, é importante a investigação da ausência de variações sistemáticas nos dados.

Para investigar essas condições, realiza-se uma análise de resíduos. Os resíduos são as diferenças entre os valores obtidos experimentalmente para o conjunto de dados e os valores que deveriam ocorrer quando esses seguem o modelo estatístico da análise de variância.

Primeiramente, verifica-se a possível existência de variações sistemáticas nos dados. Isto pode ser feito construindo-se um gráfico dos resíduos conforme a ordem dos dados, isto é, no eixo das abscissas representa-se a ordem desses dados e, no eixo das ordenadas, os respectivos resíduos. Se os pontos obtidos estiverem espalhados ao acaso, de modo a não sugerir qualquer modelo de distribuição, então, pode-se considerar que não houve variações sistemáticas. A figura 16 representa essa análise.

Figura 16 – Resíduos *versus* ordem dos dados.

Na figura 16, observa-se que os pontos estão distribuídos ao acaso e de um modo uniforme, portanto, não existem variações sistemáticas.

A segunda verificação é a homocedasticidade dos resíduos entre os grupos. Para isto, pode-se construir um gráfico, onde no eixo das abscissas representam-se os níveis dos fatores (ou seja, os grupos estudados com diferentes fluências do *laser* de baixa intensidade) e, no eixo das ordenadas, os correspondentes resíduos. Para considerar igualdade de variâncias, as dispersões (amplitude dos intervalos dos dados em cada grupo) dos pontos obtidos têm que ser aproximadamente as mesmas, conforme ilustra a figura 17.

Figura 17 – Dispersão das massas corporais dos ratos nos diferentes grupos estudados.

Essa avaliação pode ser feita visualmente. Fazendo isto na figura acima, observa-se claramente a igualdade aproximada de amplitudes dos pontos nos cinco grupos estudados, portanto, pode-se aceitar a igualdade de variabilidade entre os grupos (homocedasticidade).

Para verificar a terceira condição que é a normalidade (simetria na distribuição) dos resíduos, consideram-se os resíduos de todos os grupos conjuntamente e constrói-se o gráfico da figura a seguir, chamado de teste de normalidade dos dados.

Teste Normal.: Anderson-Darling

P-Valor: 0,229

Figura 18 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.

Na figura 18, a linha vermelha corresponde ao local onde os pontos deveriam estar no caso em que houvesse (rigorosamente) a normalidade. Quanto mais os pontos distanciarem-se da linha, menor será a possibilidade de admitir-se a normalidade. Para se ter uma maior confiabilidade nesta decisão, pode-se aplicar conjuntamente um teste estatístico de normalidade (aqui foi aplicado o teste de Anderson-Darling).

A interpretação do teste é a seguinte:

Testa-se a hipótese de normalidade contra a hipótese de não-normalidade.

1. Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05; não se rejeita a primeira hipótese, isto é, aceita-se a normalidade dos resíduos, ao nível de 5% de significância.

2. Se o p-valor for menor que 0,05; rejeita-se a primeira e, conseqüentemente, aceita-se a segunda hipótese (não-normalidade) a este nível de significância.

Nota-se na figura 18 que o p-valor, nesse caso, é de 0,229, ou seja, é maior que 0,05. Portanto, não se rejeita a normalidade dos resíduos.

Como as três condições foram satisfeitas, pode-se realizar a análise de variância paramétrica. Caso contrário, seria necessária uma transformação estatística dos dados ou então poderia ser aplicada uma análise de variância não-paramétrica (aqui o teste equivalente seria o de Kruskal-Wallis).

Na realização da ANOVA, testa-se a igualdade das médias das massas corporais dos animais entre os grupos estudados contra a diferença de médias pelo menos em dois grupos.

Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05 (nível de significância estabelecido), não se rejeita a primeira hipótese. Caso contrário, aceita-se a segunda.

O p-valor encontrado na análise de variância foi de 0,915, ou seja, maior que 0,05. Desta forma, não se rejeita a igualdade entre as médias das massas corporais dos animais nos cinco grupos estudados.

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer 003/2006

Protocolo nº 001/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar - **APROVOU** o trabalho intitulado Laser de Baixa Intensidade (670 nm) na Viabilidade do Retalho Cutâneo Randômico em Ratos do (s) autor (es) Paulo Sérgio Bossini, Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, na 5ª. Reunião, ocorrida em 21/02/2006.

São Carlos, 24 de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

APÊNDICE C

Realizou-se, analogamente, a mesma análise utilizada na massa corporal dos animais para os dados da porcentagem de necrose dos retalhos.

Como já foi explicado anteriormente (APÊNDICE A), para a realização de uma análise de variância (ANOVA), os dados devem satisfazer determinadas condições, como: normalidade (distribuições simétricas), homocedasticidade (igualdade de variâncias entre os grupos) e a ausência de possíveis variações sistemáticas nas observações.

Foi feita a análise de resíduos e inicialmente verificou-se a possível existência de variações sistemáticas. Para tal, foi construído o gráfico dos resíduos conforme a ordem dos dados (figura 19).

Figura 19 – Resíduos *versus* ordem dos dados.

Na figura 19, nota-se que os pontos estão distribuídos ao acaso e uniformemente, portanto, pode-se considerar que não existem variações sistemáticas nos dados.

Em seguida, verificou-se a homocedasticidade dos resíduos entre os grupos (figura 20).

Figura 20 – Dispersão das porcentagens de áreas de necrose dos retalhos por grupo.

Na figura 20, observa-se aproximadamente a igualdade de amplitude dos pontos nos cinco grupos, portanto, não se rejeita a igualdade entre as variabilidades (homocedasticidade).

Na sequência, foi realizado o teste de normalidade com o objetivo de verificar a distribuição dos dados (figura 21).

Figura 21 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.

Na figura 21, a linha vermelha corresponde ao local onde os pontos deveriam estar no caso em que houvesse (rigorosamente) a normalidade. Quanto mais os pontos distanciarem-se da linha, menor será a possibilidade de admitir-se a normalidade. Para uma maior confiabilidade nessa decisão, aplicou-se um teste estatístico de normalidade (teste de Anderson-Darling).

Nesse teste verificou-se a hipótese de normalidade contra a hipótese de não-normalidade dos resíduos.

1. Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05; não se rejeita a primeira hipótese, ou seja, aceita-se a normalidade, ao nível de 5% de significância.

2. Se o p-valor for menor que 0,05; rejeita-se a primeira e, conseqüentemente, aceita-se a segunda hipótese (não-normalidade) a este nível de significância.

Observa-se na figura 21 que o p-valor (0,087) é maior que 0,05, portanto, não se rejeita a normalidade dos resíduos.

Satisfeitas as três condições, pode-se então realizar a ANOVA, que tem por objetivo testar a igualdade das médias de porcentagem de necrose dos grupos estudados contra a diferença entre as mesmas.

Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05 (nível de significância estabelecido); não se rejeita a primeira hipótese. Caso contrário, aceita-se a segunda.

O p-valor encontrado na análise de variância foi de 0,0001, portanto, menor que o nível de significância de 0,05. Então, rejeita-se a hipótese de igualdade das médias de porcentagem de necrose, isto é, pelo menos dois grupos podem ser considerados diferentes em relação aos seus resultados.

Em seguida, foi feito o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais comparações intergrupos apresentaram diferenças estatísticas.

Teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o pacote estatístico Bioestat:

Média (G1) = 49.9225

Média (G2) = 41.8435

Média (G3) = 36.5125

Média (G4) = 29.4550

Média (G5) = 20.3745

Tukey:

		p-valor
Diferenças entre Médias (G1 e G2)	= 5.3763	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G3)	= 8.9239	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G4)	= 13.6205	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G5)	= 19.6633	< 0.01
Diferenças entre Médias (G2 e G3)	= 3.5476	> 0.05
Diferenças entre Médias (G2 e G4)	= 8.2442	< 0.01
Diferenças entre Médias (G2 e G5)	= 14.2869	< 0.01
Diferenças entre Médias (G3 e G4)	= 4.6965	< 0.05
Diferenças entre Médias (G3 e G5)	= 10.7393	< 0.01
Diferenças entre Médias (G4 e G5)	= 6.0428	< 0.01

APÊNDICE D

Foram realizados os mesmos testes estatísticos utilizados nos apêndices A e C para a análise dos dados da contagem dos vasos sanguíneos.

Sabe-se que, para a realização da ANOVA, os dados devem satisfazer determinadas condições, como: normalidade (distribuições simétricas), homocedasticidade (igualdade de variâncias entre os grupos) e ausência de possíveis variações sistemáticas nas observações.

Foi feita a análise de resíduos e, inicialmente, verificou-se a possível existência de variações sistemáticas. Para tal, foi construído o gráfico dos resíduos conforme a ordem dos dados (figura 22).

Figura 22 – Resíduos *versus* ordem dos dados.

Na figura 22, nota-se que os pontos estão distribuídos ao acaso e uniformemente, portanto, pode-se considerar que não existem variações sistemáticas nos dados.

Na sequência, verificou-se a homocedasticidade dos resíduos entre os grupos (figura 23).

Figura 23 – Dispersão dos números de vasos sanguíneos dos retalhos por grupo.

Na figura 23, observa-se aproximadamente a igualdade de amplitude dos pontos nos cinco grupos, portanto, não se rejeita a igualdade entre as variabilidades (homocedasticidade).

Em seguida, foi realizado o teste de normalidade com o objetivo de verificar a distribuição dos dados (figura 24).

Figura 24 – Gráfico ilustrativo do teste de normalidade dos dados.

Na figura 24, a linha vermelha corresponde ao local onde os pontos deveriam estar no caso em que houvesse (rigorosamente) a normalidade. Quanto mais os pontos distanciarem-se da linha, menor será a possibilidade de admitir-se a normalidade. Para uma maior confiabilidade nessa decisão, aplicou-se um teste estatístico de normalidade (teste de Anderson-Darling).

Nesse teste verificou-se a hipótese de normalidade contra a hipótese de não-normalidade dos resíduos.

1. Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05; não se rejeita a primeira hipótese, ou seja, aceita-se a normalidade, ao nível de 5% de significância.

2. Se o p-valor for menor que 0,05; rejeita-se a primeira e, conseqüentemente, aceita-se a segunda hipótese (não-normalidade) a este nível de significância.

Observa-se na figura 24 que o p-valor (0,614) é maior que 0,05, portanto, não se rejeita a normalidade dos resíduos.

Satisfeitas as três condições, pode-se então realizar a ANOVA, que tem por objetivo testar a igualdade das médias de vasos dos grupos estudados contra a diferença entre as mesmas.

Se o p-valor for maior que, por exemplo, 0,05 (nível de significância estabelecido), não se rejeita a primeira hipótese. Caso contrário, aceita-se a segunda.

O p-valor encontrado na análise de variância foi de 0,0001, portanto, menor que o nível de significância de 0,05. Então, rejeita-se a hipótese de igualdade das médias dos vasos, isto é, pelo menos dois grupos podem ser considerados diferentes em relação aos seus resultados.

Em seguida, foi feito o teste de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais comparações intergrupos apresentaram diferenças estatísticas.

Teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o pacote estatístico Bioestat:

Média (G1) = 65.2000
 Média (G2) = 92.6000
 Média (G3) = 105.5000
 Média (G4) = 128.7000
 Média (G5) = 171.0000

Tukey:		p-valor
Diferenças entre Médias (G1 e G2) =	5.5367	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G3) =	8.1435	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G4) =	12.8315	< 0.01
Diferenças entre Médias (G1 e G5) =	21.3791	< 0.01
Diferenças entre Médias (G2 e G3) =	2.6067	> 0.05
Diferenças entre Médias (G2 e G4) =	7.2948	< 0.01
Diferenças entre Médias (G2 e G5) =	15.8424	< 0.01
Diferenças entre Médias (G3 e G4) =	4.6880	< 0.05
Diferenças entre Médias (G3 e G5) =	13.2356	< 0.01
Diferenças entre Médias (G4 e G5) =	8.5476	< 0.01

APÊNDICE E

Teste de Correlação Linear de Pearson entre a porcentagem de necrose e o número de vasos sangüíneos dos retalhos.

Coeficiente de correlação linear de Pearson = **-0,972** (p=0,0001)

O coeficiente de correlação linear de Pearson mede o relacionamento (dependência) entre duas variáveis x e y, medidas no mesmo indivíduo. Este coeficiente varia entre -1 e 0 (correlação negativa, isto é, quanto maior x, menor será y e vice-versa) e entre 0 e +1 (correlação positiva, isto é, quanto maior x, maior y). Quanto mais próximo de -1 ou de +1, mais associadas estarão as variáveis. Se o valor obtido no teste for próximo de zero, as variáveis são independentes (não estão correlacionadas).

Neste estudo, as variáveis **porcentagem de necrose** e **número de vasos sangüíneos** são negativa e fortemente correlacionadas, ou seja, quanto menor a porcentagem da área de necrose, maior foi a quantidade de vasos sangüíneos presentes no retalho cutâneo.