

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os retalhos cutâneos constituem o recurso mais freqüentemente utilizado nas cirurgias plásticas reparadoras de perdas de substâncias, sejam traumáticas ou após procedimentos operatórios (Ferreira, 1995; Smith e Pribaz, 2000). Os retalhos são segmentos de pele obtidos de uma área doadora e transferidos para uma região receptora, mantendo uma conexão temporária ou definitiva, através de um pedículo de onde vem o suprimento sanguíneo. São caracterizados por apresentarem circulação própria, o que os tornam independentes da área receptora, para que assim possa ser assegurada a sua sobrevivência (Ferreira, 1995).

Os retalhos são definidos como 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 sanguíneo das artérias septocutâneas e cutâneas diretas. São projeções mais longas que enviam ramos para formar os plexos subdérmico e dérmico. O comprimento do retalho depende do tamanho e do trajeto da artéria que compõe o pedículo. Podem ser de dois tipos:

1. Peninsular: tem continuidade da pele da base até a ponta do retalho;

2. Em ilha: não tem continuidade da pele, levando apenas um segmento de pele interposto por um segmento apenas com o feixe neurovascular; apresenta melhor mobilidade para rotação.

Alguns eventos fisiopatológicos podem ocorrer e levar a uma falha na sobrevivência do retalho. Estes eventos podem ser ocasionados por fatores extrínsecos ou intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem algumas condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão e desnutrição) ou causas locais (compressão, tensão, trombos ou dobras no pedículo) que contrastam com o único fator intrínseco associado, a insuficiência arterial do retalho (Kerrigan, 1983; Duarte et al., 1998; Gherardini et al., 1999; Horibe e Ferreira, 1999; Salmi et al., 1999; Santos et al., 1999). Esta complicação pode ser explicada pelo seccionamento de vasos cutâneos e de terminações nervosas simpáticas que provocam a diminuição do fluxo sanguíneo ao longo do retalho (Kerrigan, 1983).

A diminuição do retalho tem originado muitos estudos que buscam melhorar a sobrevivência do mesmo através da diminuição da isquemia, que poderia ser obtida pelo aumento do aporte sanguíneo (Gherardini et al., 1999; Kjartansson et al, 1988a; Gherardini et al, 1988; Ranne et al., 1997; Averbeck et al., 1997; Jansen et al., 1999).

Muitos autores preocuparam-se em analisar o efeito de diferentes recursos, farmacológicos ou não-farmacológicos, com o intuito de encontrarem meios que favoreçam o incremento da viabilidade de retalhos cutâneos. Dentre os recursos farmacológicos podemos citar estudos que utilizaram drogas vasodilatadoras, bloqueadoras de canais de cálcio,

inibidoras de prostaglandinas, anticoagulantes, antiadrenérgicas e antioxidantes (Duarte et al., 1998; Davis et al., 1999). A utilização de algumas drogas trouxe efeitos indesejáveis, ou então a utilização das mesmas na prática clínica mostrou-se inviável (Jurell e Jonsson, 1976; Kjartansson et al., 1988a; Zhang et al., 1992; Davis et al., 1999). Sendo assim, alguns autores optaram por avaliar efeitos de recursos não-farmacológicos, como correntes elétricas polarizadas (Kjartansson et al., 1988a; Atalay et al., 2003) e não-polarizadas (Kjartansson e Lundeborg, 1990; Liebano et al., 2002), ambas de baixa frequência, energia eletromagnética pulsátil (Krag et al., 1979), acupuntura (Jansen et al., 1989), eletroacupuntura (Jansen et al., 1989) e laser de baixa potência (Kami et al., 1985; Smith, 1992; Kubota e Oshiro, 1996; Amir et al., 2000; Kubota, 2002).

Efeitos bioestimulativos do laser são relatados há 40 anos. A bioestimulação ou reações laser-catalisadas referem-se à aplicação de energia eletromagnética de baixa intensidade, geradas pelo laser, que influenciam as funções celulares, tais como, estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. A magnitude dos efeitos depende do comprimento de onda (λ) e das doses utilizadas (Beckerman et al., 1992; De Bie et al., 1998; Ortiz et al., 2001).

O laser de baixa potência é muito utilizado para diminuir o tempo de cicatrização de feridas e melhorar as condições do tecido que passou pelo processo de reparação. Estudos têm sido feitos com a finalidade de descobrir quais são os mecanismos da interação laser-tecido envolvidos neste processo.

A literatura indica que a fotobioativação acelera a cicatrização de feridas e promove angiogênese (Dyson e Young, 1986; Yu et al., 1997; Schindl et al., 1999).

Segundo Schaffer et al. (2000), o laser de diodo ($\lambda = 670$ nm) favoreceu o aumento do fluxo sanguíneo da microcirculação no local de sua irradiação. Outros autores (Benedicenti et al., 1984; Ghali e Dyson, 1992; Czernicki et al., 1994; Schindl e Schindl, 1996) relatam ainda, em seus estudos macroscópicos, que o laser de baixa potência favoreceu a microcirculação em pacientes com úlceras microangiopáticas, como as presentes na chamada Doença de Buerger.

Muitos autores afirmam que o laser de baixa potência apresenta o efeito de aumentar a circulação sanguínea nas regiões que foram irradiadas (Mester e Mester, 1989; Oshiro e Calderhead, 1991) e outros autores relatam que esta mesma irradiação incrementa a viabilidade do retalho cutâneo em ratos (Kami et al., 1985; Kubota e Oshiro, 1989; Kubota e Oshiro, 1996; Kubota, 2002). Se a aplicação de laser de diodo pode favorecer a microcirculação na porção distal do retalho, promover a angiogênese e incrementar a expressão de agentes antioxidantes, teoricamente, esta irradiação poderia favorecer a sobrevivência do retalho.

Portanto, acredita-se que seja importante investigar os efeitos deste recurso terapêutico, muito utilizado na prática clínica da fisioterapia, para avaliar a sua efetividade na viabilidade do retalho cutâneo. Considera-se ainda a importância de se descobrir se lasers de baixa potência ($\lambda = 670$ nm),

são capazes de aumentar a viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em ratos, uma vez que nenhum outro estudo avaliou esse efeito, deste laser.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito de diferentes doses de irradiação com laser de diodo de baixa potência ($\lambda = 670 \text{ nm}$), na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar efeito das seguintes doses terapêuticas na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos:

- 2,14 J/cm²;

- 5,36 J/cm²;

- 20,36 J/cm².

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

McFarlene et al. (1965) desenvolveram um modelo experimental para o estudo da necrose dos retalhos cutâneos em ratos. Os retalhos localizavam-se entre proeminências ósseas específicas, para se garantir que os vasos sanguíneos acometidos fossem os mesmos. Os retalhos apresentavam 10 cm de comprimento por 4 cm de largura, obtendo-se, desta forma, uma proporção entre comprimento e largura de 2,5:1. A completa elevação do retalho foi realizada desde a sua base (localizada na porção caudal do dorso do animal) até os ângulos inferiores das escápulas. Em 94,3% dos animais houve necrose do retalho.

Sasaki e Pang (1980) desenvolveram um modelo experimental para estudar as alterações da microcirculação e os eventuais produtos destas alterações no período pós-operatório agudo da realização de retalhos cutâneos do tipo em ilha. Neste estudo, propuseram método do gabarito de papel para a mensuração da área necrótica do retalho. Após a realização de todo o protocolo do estudo, os autores utilizaram um papel transparente para reproduzirem, com exatidão, a área total e a área necrótica do retalho. Em seguida, utilizando-se uma balança de alta precisão, aferiam o peso do papel demarcado com a área total do retalho. Em seguida, o mesmo foi realizado com a área do papel referente à área necrótica. Por fim, obtiveram a razão entre o peso do papel referente à área necrótica e o daquele referente à área total, de maneira a obter-se a porcentagem da área do retalho que sofreu necrose.

Com o objetivo de determinar a fisiopatologia da falha da sobrevivência dos retalhos cutâneos, Kerrigan (1983) estudou estes retalhos em porcos, através de microesferas radioativas. Relatou que as falhas poderiam ser atribuídas a fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos poderiam ser incluídas condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão e desnutrição) e causas locais (compressão, tensão, trombose das anastomoses ou dobras do pedículo). Contrastando com os fatores extrínsecos, aparentemente um único fator intrínseco poderia ser responsabilizado pela falha do retalho: a insuficiência arterial do retalho. Afirma ainda que a fisiopatologia da falha do retalho pode ser explicada pela secção de vasos cutâneos e das terminações nervosas simpáticas durante o procedimento operatório, que causa irrigação insuficiente dos retalhos, de forma progressiva ao longo dos mesmos. Então, o autor sugere que modalidades de tratamento que aumentem o influxo arterial para o retalho ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos podem trazer benefícios.

Finseth e Adelberg (1978) avaliaram os efeitos de agentes farmacológicos na viabilidade dos retalhos cutâneos em ratos. Estes fármacos são vasodilatadores, com longo tempo de ação. Agiam como relaxantes da musculatura vascular lisa, aumentando desta forma o calibre dos vasos e proporcionando aumento do fluxo sanguíneo. Estes fármacos são utilizados na clínica, rotineiramente. Realizaram retalhos cutâneos por ilhas neurovasculares, entre o apêndice xifóide do esterno e região abdominal, incluindo-se a pele da coxa. Estes retalhos apresentavam 8 cm

de comprimento e 8 cm de largura. Selecionaram quatro fármacos de uso clínico que foram administrados por 22 dias, sendo 15 dias antes do procedimento operatório. As drogas foram administradas em doses equivalentes às aplicadas em humanos, como se segue:

Isoxuprina – 0,33 mg/dia (agonista ou estimulador do receptor de α -catecolamina);

Guanetidina – 0,33 mg/dia (agente simpaticolítico);

Hidralazina – 0,67 mg/dia (agente relaxante da musculatura vascular lisa);

Fenoxibenzamina – 0,17 mg/dia (antagonista ou bloqueador dos receptores de α -catecolamina);

Os autores concluíram que os vasodilatadores estudados aumentam a viabilidade dos retalhos cutâneos por ilhas neurovasculares, sendo que a guanetidina obteve os resultados menos expressivos quando comparados com os demais fármacos.

Suárez Nieto et al. (1992) submeteram 108 ratos Wistar à elevação de um retalho cutâneo randômico no dorso, de base caudal, apresentando 12 cm de comprimento e 3 cm de largura. Nestes retalhos foram demarcadas áreas de 1 cm² com uma tinta definitiva, para a melhor observação da viabilidade do retalho, quando os mesmos eram tratados com alguns fármacos. Os animais foram divididos em 9 grupos, sendo um grupo controle e oito tratados com as drogas descritas a seguir: clorpromazina (15 mg/Kg/dia – um dia antes e sete dias depois do procedimento operatório), pentoxifilina (20 mg/Kg/12 Hs - um dia antes e sete dias depois do

procedimento operatório), terbutalina (0,20 mg/Kg/12 Hs - um dia antes e sete dias depois do procedimento operatório), alopurinol (35 mg/Kg - dose única, uma hora após o procedimento operatório), fenoxibenzamina (1 mg/Kg/dia - um dia antes e sete dias depois do procedimento operatório), naftidrofuril (10 mg/Kg/dia - um dia antes e sete dias depois do procedimento operatório), hidralazina (0,4 mg/Kg/12 Hs - um dia antes e sete dias depois do procedimento operatório) e trimetazidina (5 mg/Kg/12 Hs - duas horas antes e sete dias depois do procedimento operatório). Todos os grupos tratados mostraram áreas viáveis dos retalhos maiores que a do grupo controle. A hidralazina e a trimetazidina (agente antioxidante) geraram melhores resultados que as demais drogas.

Asai et al. (1997) elevaram retalhos cutâneos, de 2 x 7 cm, no dorso de trinta ratos Sprague-Dawley. Estes animais foram divididos em três grupos: controle, placebo (administração de solução salina intraperitoneal) e submetidos à iontoforese (2 ml de solução salina com 20 µg de PGE1). O eletrodo com o fármaco apresentava 2 x 5 cm. A corrente elétrica foi emitida a 4 mA de amplitude, durante 20 minutos. Os grupos controle e placebo, quando comparados entre si, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à área viável do retalho. Porém, o grupo tratado com PGE1 aumentou a viabilidade do retalho cutâneo, quando comparado com os demais grupos.

Jansen et al. (1999) estudaram a ação do CGRP (peptídeo calcitonina gene-relacionado) no incremento da viabilidade de retalhos cutâneos e no recrutamento de neutrófilos na região submetida à cirurgia, principalmente

por ser um potente vasodilatador. Trinta e seis animais foram divididos em seis grupos: controle, 10^{-18} , 10^{-15} , 10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} mol CGRP (0,5 ml), administrados de forma intraperitoneal, 20 minutos antes do procedimento operatório. Além da área viável do retalho, foram avaliados a concentração de mieloperoxidase (marcador de neutrófilos), a pressão arterial e o fluxo sanguíneo do retalho. Concluíram que o CGRP intraperitoneal aumenta a viabilidade dos retalhos cutâneos, de forma dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior a eficiência. Porém, a administração do fármaco não modificou o padrão das respostas da pressão arterial ou do fluxo sanguíneo no retalho. Quando comparadas as concentrações de mieloperoxidase no grupo controle e nos grupos tratados, observou-se a diminuição estatisticamente significativa nos grupos tratados com CGRP, que pode ser entendido como uma diminuição do recrutamento de leucócitos. Sendo assim, hipotetiza-se que houve diminuição do processo inflamatório, com conseqüente diminuição da formação de edema.

Zhang et al. (2003) avaliaram a concentração do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) endógeno e sua relação com a lipoperoxidação em retalhos cutâneos randômicos em ratos, além da ação VEGF exógeno na viabilidade de retalhos isquêmicos. Cinqüenta e dois animais foram submetidos ao procedimento operatório de elevação do retalho cutâneo randômico de 3 cm de largura e 10 cm de comprimento.

Destes animais, vinte e quatro foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tempo de biópsia pós-operatória (0 Hs, 6 Hs, 12 Hs e 24 Hs). Os tecidos que ofereceram material estavam dispostos a 2,5 cm, 5,5 cm e 8,5

cm da margem distal do retalho. Os autores avaliaram a concentração de malonildialdeído (MDA), que é utilizado como forma de exame da lipoperoxidação, e da concentração de VEGF. Até 12 horas após o procedimento operatório, não houve diferença estatisticamente significativa da concentração de MDA nos diferentes níveis de coleta de material, porém, 24 horas após a elevação do retalho, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre a contração de MDA da porção distal do retalho, quando comparada com a porção medial no mesmo momento, ou seja, 24 horas após o procedimento e entre a porção distal nos momentos 12 e 24 horas após a cirurgia.

Os vinte e oito animais restantes foram divididos em dois grupos. Um grupo controle e um grupo tratado com 1 ml de VEGF exógeno (1 μ g/ml) injetado sob a derme na porção mais distal do retalho (3 x 4 cm). O grupo controle recebeu o mesmo volume, nas mesmas porções do retalho, de solução salina. O grupo tratado apresentou viabilidade em 89% da área do retalho, enquanto o grupo controle apenas 64%. Os autores concluíram que a administração de VEGF exógena aumenta a viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos.

Em 2005, Esteves Júnior et al. investigaram o efeito da administração tópica do Cloridrato de Hidralazina, por iontoforese, na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. Sessenta animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos. Os animais do grupo 1 submeteram-se a colocação de eletrodos metálicos (3,0 x 5,0 cm) para emissão de corrente galvânica posicionados na base do retalho (negativo) e no abdome (positivo)

do animal, sendo que entre a pele do animal e os eletrodos havia uma almofada de gaze contendo 3ml de solução fisiológica. Estes permaneceram nesta posição por 20 minutos, porém sem a emissão de qualquer estímulo pelo eletroestimulador. Os animais do grupo 2 foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo 1 porém, os eletrodos emitiram corrente galvânica com amplitude de 4 mA durante 20 minutos. Os animais do grupo 3 também foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados nos animais grupo 1, porém substituindo a solução fisiológica colocada na gaze sob eletrodo (negativo) situado no dorso do animal por 3 ml de Cloridrato de Hidralazina diluído em solução fisiológica a uma concentração de 0,2/mg/ml, nestes animais o eletroestimulador não emitiu qualquer estímulo. Os animais do grupo 4 submeteram-se aos mesmos procedimentos do grupo 3, porém estes receberam a estimulação com corrente Galvânica, como citada no grupo 2 (iontoforese). Estes procedimentos repetiram-se por dois dias subsequentes (PO1 e PO2). A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi verificada no sétimo dia após a técnica operatória por meio de gabarito de papel. Os resultados não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

O laser de baixa potência é um recurso fisioterapêutico bastante utilizado nos processos cicatriciais, tanto na fase aguda, quanto na crônica. Ele aumenta a produção de enzimas ligadas ao processo de regeneração tecidual como a superóxido dismutase (SOD), que é um agente antioxidante; modula o recrutamento de leucócitos para o sítio de lesão, favorecendo a fagocitose; aumenta a síntese de ATP, incrementando a produção de

proteínas necessárias para a adequada cicatrização; promove a angiogênese necessária para viabilizar o processo de reparação tecidual (Baxter, 1994).

Em 1990, Sugrue et al. submeteram 12 sujeitos que apresentavam úlceras venosas crônicas em membro inferior, ao tratamento com laser de dois tipos: GaAlAs ($\lambda = 780$ nm) e AsGa ($\lambda = 904$ nm). A irradiação foi realizada com a duração de vinte minutos e os indivíduos foram tratados três vezes por semana, durante doze semanas. Os pesquisadores revelaram redução das úlceras, aumento do tecido epitelial, redução da dor e aumento da rede capilar. Este último achado é um dos principais fatores para obter-se sucesso no tratamento de úlceras, uma vez que a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) possibilita um fornecimento de oxigênio e nutrientes mais adequado para atender às necessidades da fase proliferativa do processo de reparo tecidual (Kitchen e Bazin, 1998).

Irradiando úlceras de pressão grau III com laser infravermelho ($\lambda = 904$ nm, $F = 830$ Hz, potência média de 8 mW e densidade de energia de 1 J/cm²), por um período de 6 semanas, Lucas et al. (2000) encontraram uma diminuição significativa do valor da mediana das áreas das úlceras tratadas com laser associado a um tratamento consensual, em comparação ao grupo submetido somente ao tratamento consensual.

Com auxílio da avaliação por imagem de ressonância magnética, Schaffer et al. (2000) notaram um aumento significativo do fluxo sanguíneo da microcirculação da planta do pé, quando esta região foi irradiada com laser de baixa potência ($\lambda = 780$ nm, irradiância de 100 mW/cm², densidade

de potência de 5 J/cm²), sem haver alteração da temperatura local, que foi avaliada através de dispositivos termossensíveis alocados na região corporal avaliada naquela oportunidade.

Vários estudos experimentais indicam que a administração exógena de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que é um fator de crescimento relacionado a angiogênese e ao aumento da permeabilidade vascular (Flamme et al., 1995; Hippenstiel et al., 1998), pode induzir angiogênese regional e favorecer a sobrevivência dos retalhos cutâneos (Padubidri e Browne, 1996; Li et al., 2000).

Schindler (1998) relata que o laser de baixa potência acelera o processo de reparação celular endotelial por promover angiogênese. Almeida-Lopes (2001) refere que há também o aumento na síntese de fatores de crescimento que favorecem a proliferação de queratócitos. A liberação de fatores de crescimento e a epitelização precoce também são favorecidos pela irradiação laser (Schindler, 1998).

Alguns autores acreditam que os radicais livres são importantes mediadores da isquemia, favorecendo a destruição tecidual. Eles podem participar de reações em cadeia e causarem peroxidação das membranas celulares e das proteínas intracelulares, resultando em lesões celulares irreversíveis (Aikens e Dix, 1991; Almeida-Lopes, 2001; Zhang et al., 2003). Segundo Stadler et al. (2000), o laser de baixa potência ativa a liberação de SOD (superóxido dismutase), auxiliando na inibição da ação dos radicais livres.

Em 1985, Kami et al., utilizaram um emissor de 830 nm, potência de 15 mW, feixe emissor de 0,02 cm², utilizando-se de 16 J/cm², em três grupos experimentais, sendo um deles controle (área de necrose de 53,81%). O primeiro grupo sofreu irradiação no período pré-operatório, durante cinco dias, sendo que imediatamente após a irradiação no quinto dia houve a elevação do retalho cutâneo. Após sete dias do procedimento operatório, houve a mensuração da área de necrose, obtendo-se o valor de 47,44%. No segundo grupo, foram realizadas 5 aplicações de laser, a cada 24 horas, iniciadas no pós-operatório imediato; No sétimo dia após o procedimento operatório, foi realizada a mensuração dos resultados, que revelaram uma área de necrose de 46,48%. Concluíram que houve incremento na viabilidade do retalho nos grupos tratados, com significância estatística ($p < 0,05$ no grupo tratado no período pré e $p < 0,01$ no grupo tratado no período pós-operatório). Observaram também, através de microangiografia, a proliferação de vasos sanguíneos ao redor do local irradiado por laser.

Smith et al. (1992) avaliaram o efeito do laser de baixa potência na viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em ratos e em porcos. Vinte ratos foram divididos em dois grupos. Estes animais foram submetidos à elevação de retalhos cutâneos randômicos, com base caudal, em seus dorsos. Estes retalhos apresentavam 2 x 7 cm. A crista ilíaca foi utilizada como referência anatômica para a confecção dos retalhos. Além dos ratos, cinco porcos foram submetidos à elevação dos retalhos. Em cada porco foram realizados oito retalhos, sendo quatro de cada lado do dorso. Estes retalhos foram dispostos a 4 cm da coluna vertebral. O primeiro retalho

localizava-se 3 cm abaixo do ângulo inferior da escápula. Havia 3 cm de distância entre um retalho e outro. Os autores utilizaram laser de HeNe contínuo ($\lambda = 632,8$ nm), com potência de 2,75 mW, densidade de potência de 310 mW/cm^2 , com tempo de aplicação de $30 \text{ s/cm}^2/\text{dia}$, técnica de varredura, durante 10 dias, sendo 5 antes e 5 depois do procedimento operatório. O grupo controle foi tratado com luz branca não-coerente, policromática por $30 \text{ s/cm}^2/\text{dia}$. A área necrótica do retalho foi avaliada no PO_5 , utilizando-se de papel milimetrado. Não foi verificado aumento na viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos em nenhum dos animais.

Kubota e Oshiro (1996) avaliaram as respostas da microcirculação e a viabilidade dos retalhos através da fluxometria por laser *Doppler*, em retalhos cutâneos de base caudal de 9×3 cm, irradiados com laser de baixa potência. Vinte ratos foram divididos em dois grupos: controle e tratado (irradiação laser GaAlAs, energia de 60 mW e $\lambda = 830$ nm). Os animais tratados foram submetidos à irradiação de 36 J/cm^2 , por 1 minuto, num ponto único localizado no centro da base caudal do retalho. Todos os animais foram submetidos ao laser *Doppler* antes do tratamento, imediatamente após a irradiação e 30 minutos após o tratamento. Em ambos os grupos não houve alteração da perfusão da microcirculação, quando avaliados imediatamente após a irradiação. Porém, no grupo controle, houve diminuição na perfusão da microcirculação, enquanto, no grupo tratado, houve aumento significativo da perfusão, quando a mesma foi avaliada 30 minutos após o tratamento.

Após cinco dias da elevação do retalho os animais do grupo controle apresentaram 39,2% de área necrótica, enquanto os animais tratados apresentaram 32,1%.

Amir et al. (2000) avaliaram a ação do laser HeNe ($\lambda = 632,8$ nm; energia de 6 mW) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. Trinta animais foram submetidos à elevação do retalho cutâneo randômico de base cranial, iniciando-se na base das orelhas. Estes retalhos apresentavam dimensão de 2,5 x 8 cm. Os animais foram divididos em três grupos. O grupo controle (grupo I) continha os animais submetidos ao procedimento operatório, mas que não foram tratados. No PO_{15} foi avaliada a média do comprimento da distância entre a base do retalho e a área necrótica. No grupo II os animais foram irradiados com laser HeNe na área de transição (3,5 – 5,5 cm da base do retalho) durante 5 dias consecutivos, por 5 min/dia e densidade de energia de 2,9 J/cm². No grupo III os animais foram irradiados na zona de transição e nos próximos 2 cm após esta (3,5 – 7,5 cm da base do retalho) durante 5 dias consecutivos, por 10 min/dia e densidade de energia de 2,9 J/cm². Nos grupos II e III, a distância média entre a base do retalho e a área necrótica foi, respectivamente, 4,89 cm e 4,95 cm. Quando analisados estatisticamente, estes dados mostram que o laser HeNe aumentou a viabilidade dos retalhos.

Kubota (2002), utilizou um emissor de laser contínuo de 100 mW de potência, $\lambda = 830$ nm, com feixe emissor de 0,0054 cm² e densidade de energia de 185 J/cm², para irradiar num único ponto, 40 animais divididos em 4 grupos. No primeiro grupo, os animais foram irradiados sobre a região

da artéria iliolumbar. No segundo grupo, a irradiação aconteceu no ponto médio da linha distal do retalho de base cranial e no terceiro grupo, houve a irradiação no ponto médio da linha proximal do retalho de base cranial. O quarto grupo não sofreu irradiação, sendo utilizado como controle.

O autor observou que houve aumento significativo da viabilidade do retalho em todos os animais que foram irradiados ($p < 0,01$), quando comparados com o grupo controle (grupo controle apresentou 24,55% da área necrosada, o irradiado na artéria iliolumbar 7,77%, o irradiado na porção proximal do retalho 8,88% e o irradiado na porção distal 11,11%), porém não houve diferença estatística significativa quando os grupos que foram submetidos à irradiação laser foram comparados entre si, não havendo prevalência no resultado quando se altera a região estimulada, dentre as propostas pelo autor.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo experimental, randomizado, duplo-cego, em ratos, para comparar o efeito de três diferentes doses de laser de baixa potência na viabilidade dos retalhos cutâneos randômicos. O experimento atendeu aos princípios éticos para trabalhos experimentais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) - São Paulo, Brasil, 1991.

4.2 Aprovação da Comissão de Ética

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital Das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3 Situação

O trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Experimental do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista (UNIP), *Campus* Indianópolis – São Paulo.

4.4 Amostra

Quarenta ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. *Albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), pesando entre 251 e 358 g, foram submetidos a este estudo.

4.5 Equipamento

Utilizou-se o emissor de laser de baixa potência Physilux Dual (BIOSET Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil), que apresenta a emissão de laser de diodo vermelho ($\lambda = 670 \text{ nm}$), potência de saída de 30 mW, área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, além de óculos de proteção contra irradiação laser, papel vegetal, filme plástico F1, caneta porosa, material cirúrgico (agulha, fio de náilon 4-0, pinça e tesoura cirúrgica) e um molde confeccionado para padronizar a aplicação de laser de baixa potência, anestésico Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan, éter etílico, balança de alta precisão MARTE AL-500 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda – São Paulo).



Figura 1: Equipamento emissor de laser (Physilux Dual – BIOSET - Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil)

4.6 Grupos de estudo

Os 40 ratos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo ração e água *ad libitum*, num ambiente onde o ciclo claro-escuro (12 Hs/ 12 Hs) e a temperatura (21°C) foram controlados, além de serem distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais da seguinte maneira:

Grupo 1 - controle (G1) – controle com retalho cutâneo randômico e simulação da emissão da radiação laser;

Grupo 2 (G2) – grupo com retalho cutâneo randômico submetido à radiação laser $\lambda = 670$ nm, a $2,14$ J/cm² de densidade de energia, por 2 s, fornecendo 0,056 J de energia por ponto;

Grupo 3 (G3) - grupo com retalho cutâneo randômico submetido à radiação laser $\lambda = 670$ nm, a $5,36$ J/cm², durante 5 s, fornecendo 0,15 J de energia por ponto;

Grupo 4 (G4) - grupo com retalho cutâneo randômico submetido à radiação laser $\lambda = 670$ nm, a $20,36$ J/cm², durante 19 s, fornecendo 0,57 J de energia por ponto.

4.7 Técnica operatória

Os animais foram pesados (Anexo) e anestesiados com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepan (25 mg/Kg). Subseqüentemente, realizou-se a tricotomia digital no dorso dos mesmos, que se encontravam posicionados numa superfície plana e com extensão dos quatro membros. Foi demarcada a área onde haveria a

elevação do retalho com caneta dermográfica preta, respeitando-se como limites anatômicos os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica.

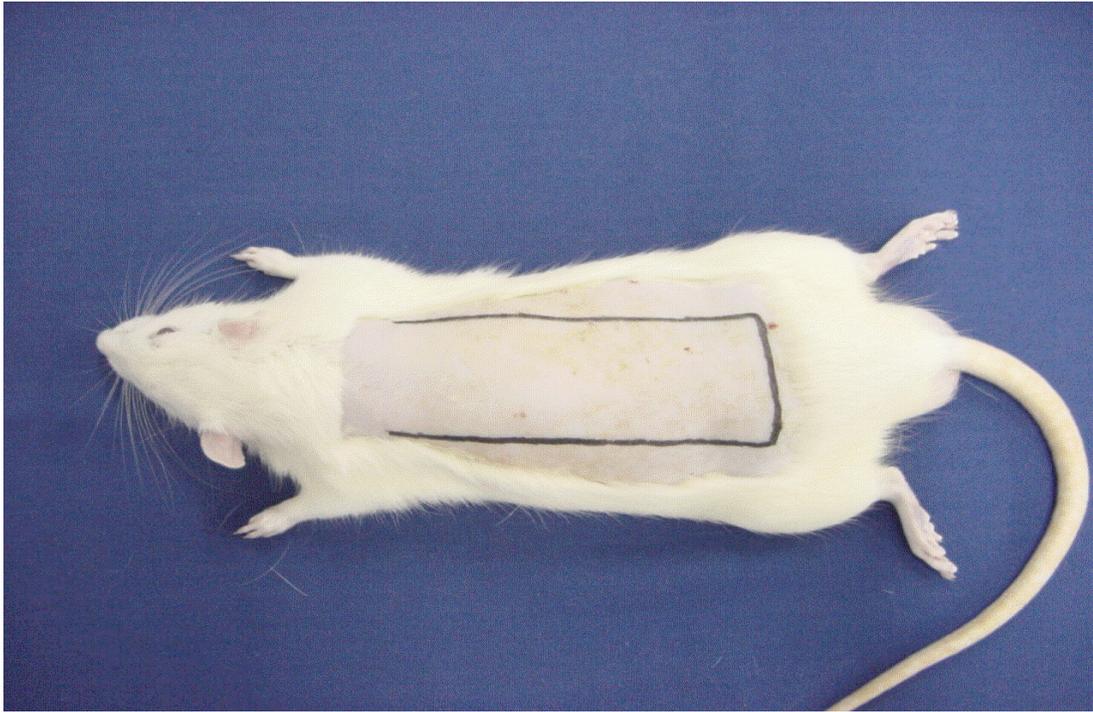


Figura 2: Aspecto do dorso do animal após a tricotomia e demarcação da área de elevação do retalho cutâneo

Então, foi realizado o retalho cutâneo randômico de base cranial, com 10 cm de comprimento e 4 cm de largura, elevados do dorso dos animais de ambos os grupos, seguindo modelo experimental de McFarlene (1965) e utilizado por Asai et al. (1997) e Liebano et al. (2002).



Figura 3: Elevação do retalho e posicionamento da barreira plástica F1

O retalho constituído pela fáscia superficial, panículo carnoso, tecido subcutâneo e pele, depois de elevado, foi reposicionado em sua localização original, após a interposição de uma barreira plástica (filme F1) entre a fáscia superficial e a camada muscular superficial, com as mesmas dimensões do retalho, para evitar que houvesse revascularização do leito. A sutura foi realizada com 25 pontos simples com fio de náilon monofilamentar 4-0 (Asai et al., 1997; Liebano et al., 2002).

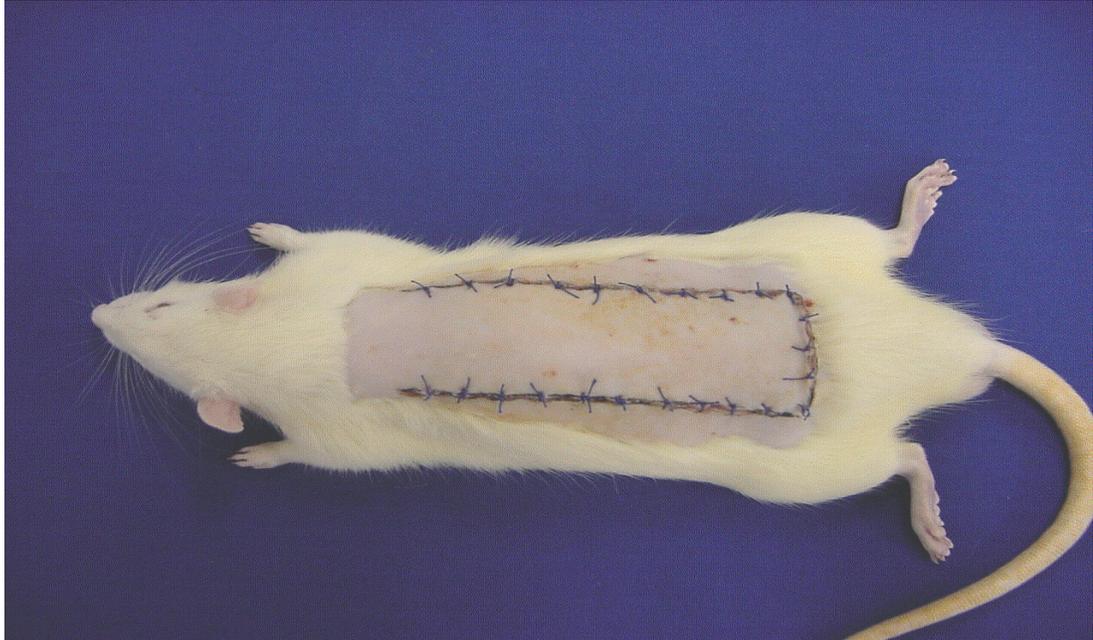


Figura 4: Aspecto do animal após a realização da sutura do retalho com fio de náilon monofilamentar 4-0

Foi confeccionado um molde de cartolina preta, de mesmas dimensões da área do retalho cutâneo randômico, que apresentava fenestrações (pontos de emissão de laser) para que se pudesse encaixar a ponteira da *probe* e emitir os feixes de laser para a pele do animal (na porção cranial do retalho) sem nenhuma interferência no transporte do feixe, de forma que, quando a região cranial deste molde estivesse em contato com o ângulo inferior da escápula do mesmo, suas laterais estariam posicionadas exatamente sobre as margens laterais do retalho, garantindo que a radiação laser se daria sempre nas mesmas regiões dos retalhos dos animais estudados. Estes pontos de radiação foram dispostos a 1 cm da margem do retalho e a 1 cm entre si. Desta maneira, foram confeccionados 12 pontos na metade cranial do molde do retalho, sendo estes os pontos que receberam a radiação laser.

Após este procedimento, os animais do G1 foram anestesiados por 20 minutos para que fosse posicionada a *probe* do equipamento de emissão de radiação laser, mas sem a verdadeira emissão. Os animais do G2 também foram submetidos à anestesia por 20 minutos, para receberem a radiação laser com $\lambda = 670 \text{ nm}$ e $2,14 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia (0,06 J). Os animais do G3 foram submetidos aos mesmos procedimentos que os animais do G2, porém com $5,36 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia (0,15 J). Finalmente os animais do G4 passaram pelos mesmos procedimentos executados nos grupos anteriores, porém sofreram uma radiação de $20,36 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia (0,57 J), com laser de diodo de $\lambda = 670 \text{ nm}$.



Figura 5: Posicionamento do animal, da *probe* e do molde para a aplicação da irradiação laser

Todos os animais submetidos à irradiação laser foram tratados no pós-operatório imediato, no primeiro dia pós-operatório e no segundo dia pós-operatório. Em todas as irradiações, a técnica de contato foi utilizada.

4.8 Método de determinação da porcentagem da área de necrose

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi verificada no sétimo dia após a técnica operatória por meio de gabarito de papel proposta por Sasaki e Pang (1980), sendo que foi considerado como limite de tecido viável aquele caracterizado por pele macia, rósea, quente e com pêlos enquanto o tecido necrótico por pele rígida, escurecida, fria e sem pêlos. Essas áreas foram demarcadas nos animais e também no papel que foi pesado em balança de alta precisão (erros de +/- 0,001 g), nos oferecendo a possibilidade de verificarmos qual a porcentagem de tecido necrótico obtida em ambos os grupos, utilizando a seguinte fórmula:

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

Os papéis transparentes (papel vegetal) utilizados para a demarcação foram todos produzidos pela mesma empresa e todos os demarcados foram pesados pela mesma balança de alta precisão.

4.9 Descarte dos animais

Após a eutanásia, os animais foram preparados, passando por um processo de congelamento, para serem descartados segundo as exigências dos princípios éticos para trabalhos experimentais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) - São Paulo, Brasil, 1991.

4.10 Avaliação estatística dos resultados

Para avaliarmos as possíveis diferenças quanto à porcentagem de necrose e a homogeneidade dos grupos, utilizamos os testes não-paramétricos para "k" amostras independentes de *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison*.

O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05 (5%).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Depois de realizada a análise estatística, foram encontrados os seguintes dados:

Tabela 1 – Porcentagem da área de necrose dos diferentes grupos – PO₇

Animal	G1	G2	G3	G4
1	45,01	32,82	53,85	36,61
2	50,8	21,17	43,54	41,57
3	46,93	32,29	61,97	25,95
4	58,54	62,95	57,14	14,8
5	55,8	37,5	42,4	32,02
6	55,29	58,26	47,27	15,04
7	39,43	54,32	47,6	39,39
8	45,6	27,95	38,42	32,82
9	45,07	24,22	38,46	21,17
10	51,06	39,92	39,47	32,29
Média	49,35	39,14	47,01	29,17

G4 < G2 = G3 = G1 (nível de significância p < 0,001, segundo *Dunn's Multiple Comparison Test*)

G1= grupo controle
 G2= grupo 2 (2,14 J/cm²)
 G3= grupo 3 (5,36 J/cm²)
 G4= grupo 4 (20,36 J/cm²)

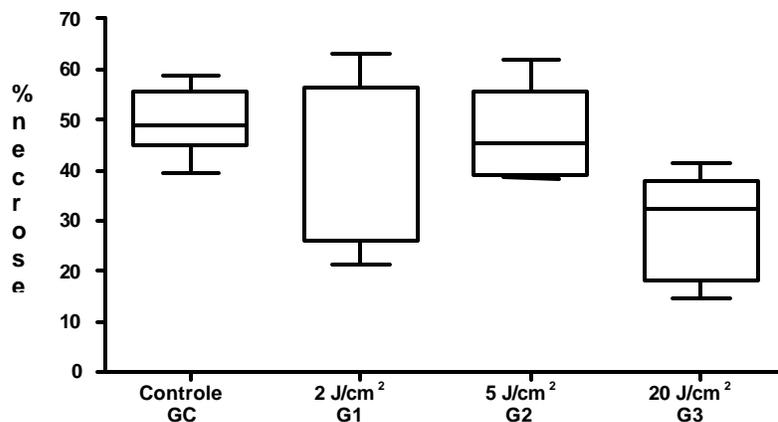


Figura 6: Distribuição da porcentagem da área de necrose do retalho cutâneo randômico em ratos

Após a obtenção dos dados observou-se que o G1 apresentou valores da área de necrose do retalho que variaram de 39,43% a 58,54%, obtendo uma média de 49,35%. Os valores em G2 variaram de 21,17% a 62,95%, gerando um valor médio de 39,14%; G3 38,42% a 61,97%, média de 47,01% e G4 14,80% a 41,57%, média de 29,17%.



Figura 7: Apresentação da área necrótica média do retalho dos animais do G1, no PO₇

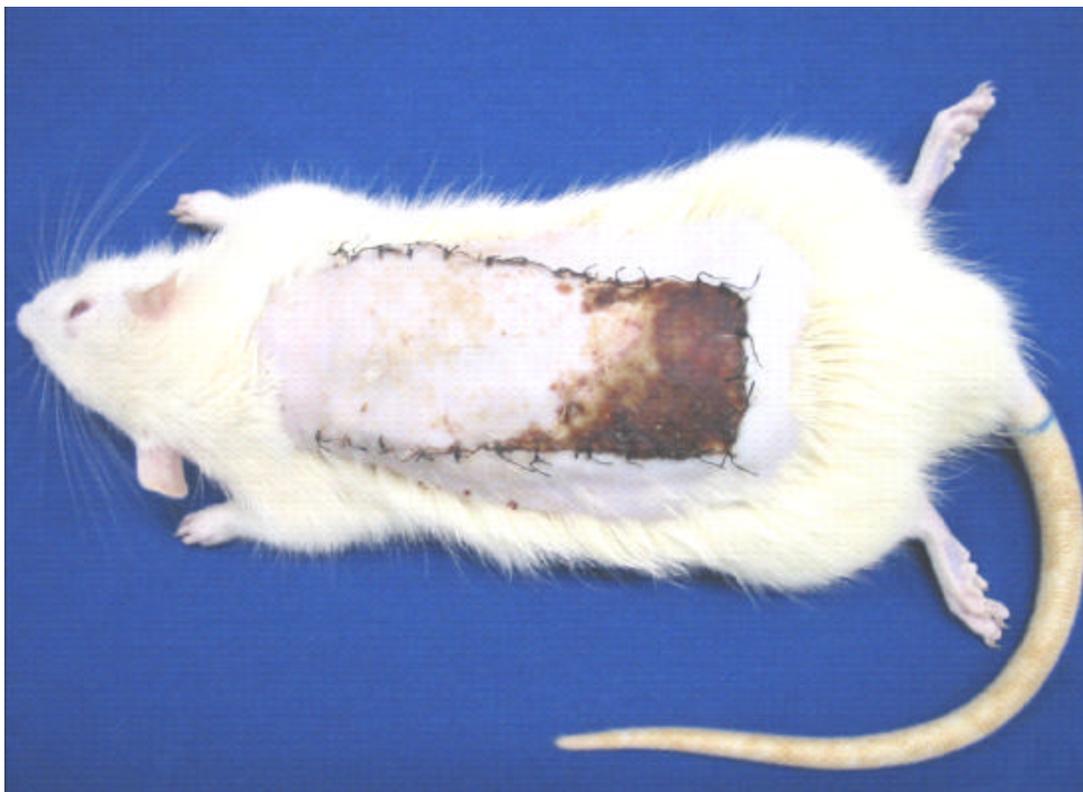


Figura 8: Apresentação da área necrótica média do retalho dos animais do G1, no PO₇

Tabela 2 – Resultados da comparação entre os grupos, dois a dois, após *Dunn's Multiple Comparison test*

<i>Dunn's Multiple Comparison Test</i>	Valor de P	Significância
G1 x G2	P > 0.05	ns
G1 x G3	P > 0.05	ns
G1 x G4	P < 0.001	**

** Altamente significativo

Realizou-se a comparação dos valores obtidos entre G1-G2, G1-G3 e G1-G4, onde observamos diferença estatisticamente significativa apenas entre G1-G4 para *Kruskal-Wallis test* ($p= 0,0007$) e *Dunn's Multiple Comparison test* ($p < 0,001$), enquanto que o mesmo não ocorreu nas demais comparações, onde $p > 0.05$.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi adotado o modelo de retalho cutâneo em ratos, embora se saiba que a pele do porco é a que mais se assemelha à pele humana, porém, devido à facilidade na obtenção, manuseio, grande número de estudos com este modelo e custos, o rato foi eleito. No homem, o panículo adiposo (tela subcutânea superficial) é firmemente ligado a fáscia profunda podendo ser comparado ao panículo carnoso do rato, que é aderente à derme, no que diz respeito ao suprimento sanguíneo para a pele (McFarlane et al., 1965).

Foi realizado o retalho cutâneo dorsal de base cranial no rato, proposto por McFarlane et al., (1965) como modelo experimental para se estudar a necrose e prevenção da mesma. A dimensão de 10 centímetros de comprimento e 4 centímetros de largura, deste retalho, apresenta uma porcentagem de necrose entre 25 e 50% em sua porção distal, sendo que em 5,7% dos casos não é observada uma necrose significativa (Gomes et al., 1994). Para se tentar obter condições mais uniformes de necrose, neste modelo, foi interposto um filme plástico F1, com as mesmas dimensões do retalho, colocado entre o retalho e seu leito a fim de impedir a revascularização através de vasos do mesmo (Ugland, 1966; Kaufman, 1985), observando-se assim uma necrose significativa (Gomes et al., 1994; Duarte et al., 1998; Liebano et al., 2002). Neste estudo foi encontrado 48,87% de área necrótica.

Em 1985, Kami et al. elevaram retalhos de base caudal no dorso de ratos, com 9 cm de comprimento por 3 cm largura e encontraram 53,81% da área do retalho necrosada. Sete anos mais tarde, Smith et al. (1992) utilizaram retalhos de base caudal com 7 cm de comprimento e 2 cm de largura em ratos e confeccionaram retalhos de mesmas dimensões no dorso de porcos, distribuídos a 4 cm e perpendicularmente à coluna vertebral, com base medial, obtendo nos ratos 53,35% de área necrótica, enquanto nos porcos 32,35%. Amir et al. (1999), submeteram ratos à elevação de retalhos de base cranial, com 8 cm de comprimento e 2,5 cm de largura e obtiveram 51,5% da área do retalho inviabilizada. Estes modelos de retalho cutâneo randômico apresentam áreas de necrose semelhantes ao realizado neste estudo. Porém, em nenhum deles foi interposta alguma barreira plástica entre o retalho e o leito vascular do dorso dos animais.

O método do gabarito de papel, descrito por Sasaki e Pang (1980), foi utilizado para avaliar a porcentagem da área de necrose, que se deu no sétimo dia pós-operatório, por expressar confiabilidade (erro menor que 5%), por ser de fácil aplicabilidade, além de ser amplamente utilizado na literatura, o que viabiliza as comparações de resultados. A avaliação da área de necrose foi realizada por um observador que não participou do estudo, para se evitar qualquer interferência nos resultados. Outros autores (Kami et al., 1985; Duarte et al., 1998; Gomes et al., 1998; Atalay et al. 2003) também avaliaram a área necrótica do retalho no sétimo dia pós-operatório, já que este é o tempo necessário para a delimitação da área necrótica.

Gomes et al. (1998) compararam os resultados obtidos, em relação à determinação da área de necrose, utilizando-se do método de gabarito de papel e da planimetria computadorizada e concluíram, através de análise estatística, que os resultados quando interpretados por ambos os métodos não apresentam diferenças estatísticas, salientando que o método de gabarito de papel (Sasaki e Pang, 1980) é de fácil aplicabilidade. Além disso, a grande maioria dos autores utiliza desta técnica de análise, o que levou a sua escolha para que as comparações dos resultados se tornassem mais fidedignas.

O protocolo utilizado neste estudo não trouxe problemas em relação à sua aplicabilidade e reprodutibilidade, além de preservar a vida dos animais até o momento proposto para a eutanásia. Durante este experimento, nenhum animal morreu previamente ao período pré-determinado pelo protocolo de pesquisa.

Kerrigan (1983) sugere que modalidades de tratamento que aumentem o influxo arterial para o retalho ou estabilizem a membrana celular em tecidos isquêmicos podem trazer benefícios, pois após estudar os mecanismos fisiopatológicos da falha dos retalhos, afirmou que as mesmas poderiam ser atribuídas a fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos poderiam ser incluídas condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão e desnutrição) e causas locais (compressão, tensão, trombose das anastomoses ou dobras do pedículo). Um único fator intrínseco poderia ser responsabilizado pela falha do retalho: a insuficiência arterial do retalho.

Muitas pesquisas têm utilizado o laser de baixa potência visando obter diminuição do tempo de cicatrização de feridas, assim como, melhorar as condições do tecido que passou pelo processo de reparação. Estudos têm sido feitos com a finalidade de tentar descobrir quais mecanismos de interação laser-tecido estão envolvidos neste processo.

Para este estudo os valores de porcentagem de necrose do grupo controle (G1) variaram entre 39,43% e 58,54%, apresentando a média de 48,87%. No grupo 2 (G2), em que os animais foram submetidos à irradiação laser com fluência de 2,14 J/cm², a porcentagem da área do retalho que sofreu necrose variou entre 21,17% e 62,95%, tendo como média 35,16%. No grupo 3 (G3), cujos animais foram irradiados com fluência de 5,36 J/cm², os valores da porcentagem de necrose permaneceram entre 38,42% e 61,97%, com média de 45,41%. Finalmente, no grupo 4 (G4), os animais foram irradiados com fluência de 20,36 J/cm², os valores variaram entre 14,8% e 41,57%, com média de 32,16%. Quando estes resultados foram comparados estatisticamente, houve diferença significativa somente entre o resultado obtido no G4 e no G1 ($p < 0,001$).

Muitas variáveis da irradiação laser podem interferir na atividade celular e, por conseqüência, nos resultados obtidos. Entre eles, podemos citar o comprimento de onda, a freqüência, a densidade de energia, a potência, a irradiância, a energia total emitida e a técnica de aplicação.

O laser de diodo de baixa potência de 670 nm foi eleito neste estudo, uma vez que nenhum outro autor avaliou as respostas do retalho cutâneo submetido a este tipo de laser. Os estudos, a cerca deste tema, encontrados

na literatura trazem ensaios com lasers de comprimento de 632,8 nm (Smith et al., 1992; Amir et al., 2000) e 830 nm (Kami et al., 1985; Kubota e Oshiro, 1996; Kubota, 2002), todos com emissão contínua do feixe luminoso. Neste estudo, houve aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos submetidos à irradiação laser, corroborando com os dados obtidos estudos supracitados, exceto Smith et al. (1992) que não encontraram significância estatística em seu estudo.

Em relação à densidade de energia é observada enorme discrepância nos índices propostos pelos diversos autores, já que encontramos valores que variam entre $0,88 \text{ J/cm}^2$ (Smith et al., 1992) e 185 J/cm^2 (Kubota, 2002). Segundo a lei de Arndt-Schultz, as células sofrem bioestimulação se forem irradiadas com baixas doses de energia e bioinibição se irradiadas com altas doses de energia (Baxter, 1994). Neste estudo, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um deles, controle. Os demais grupos apresentaram densidade de energia de $2,14 \text{ J/cm}^2$, $5,36 \text{ J/cm}^2$ e $20,36 \text{ J/cm}^2$. Somente no grupo em que os animais foram irradiados com $20,36 \text{ J/cm}^2$, observou-se aumento estatisticamente significativo da viabilidade do retalho. No entanto, quando observamos os resultados deste estudo e de Smith et al., 1992 e Kubota, 2002, notamos que os resultados, aparentemente, não obedecem à lei de Arndt-Schultz, já que irradiações com $0,88 \text{ J/cm}^2$ (Smith et al., 1992), $2,14 \text{ J/cm}^2$ ou $5,36 \text{ J/cm}^2$ (doses utilizadas neste estudo) não conseguiram melhorar as condições de isquemia do retalho cutâneo, enquanto aquelas com 185 J/cm^2 promoveram aumentos significativos da viabilidade dos mesmos.

Então, considera-se importante a observação dos demais parâmetros que influenciam nas respostas celulares obtidas pela irradiação laser, na tentativa de se entender os resultados colhidos.

Naqueles estudos onde se encontrou um aumento da viabilidade do retalho após irradiação com laser de baixa potência (Kami et al, 1985; Kubota e Oshiro, 1996; Amir et al., 2000; Kubota, 2002) são observadas emissões de energia por ponto de aplicação, variando entre 0,3 J e 1 J, o que corrobora com os achados do G4 deste estudo (0,56 J). Na única publicação cujos resultados não são favoráveis à estimulação laser (Smith et al., 1992), a energia aplicada sobre os retalhos foi de 0,0825 J, ou seja, muito abaixo daquelas citadas anteriormente. No G2 e G3 deste estudo, a energia aplicada foi de 0,15 J e 0,06 J e, neles, também não foram encontrados efeitos benéficos gerados pela irradiação. Possivelmente, este foi o fator decisivo para a discrepância dos resultados e o que viria confirmar que as células modificam suas atividades biológicas, frente à irradiação laser, de acordo com o proposto pela Lei de Arndt-Shultz.

Alguns autores (Benedicenti, 1984; Czernicki et al., 1994; Wilden e Karthein, 1998; Schaffer et al., 2000) utilizando-se de equipamentos que emitam lasers com comprimentos de onda de 630 nm, 780 nm e 904 nm, revelaram que o laser de diodo de baixa potência tem a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo na microcirculação por aumentar a liberação de óxido nítrico (NO), que é um potente vasodilatador, no local irradiado. Além disso, afirmam que este recurso não eleva a temperatura tecidual

significativamente, de forma que passa ser um instrumento útil de tratamento, mesmo quando ainda exista um quadro inflamatório agudo.

A literatura indica que a fotobiomodulação acelera a cicatrização de feridas e promove angiogênese (Dyson e Young, 1986; Yu et al., 1997; Schindl et al., 1999), o que pode ser utilizado como justificativa para os resultados obtidos neste estudo, os quais corroboram com os trabalhos de outros autores (Kami et al., 1985; Kubota e Oshiro, 1996; Kubota, 2002) que estudaram o efeito do laser de diodo de baixa potência na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, encontrando resultados positivos em seus ensaios.

Em 1990, Sugrue et al. submeteram 12 sujeitos que apresentavam úlceras venosas crônicas em membro inferior, ao tratamento com laser de dois tipos: GaAIA ($\lambda = 780$ nm) e AsGa ($\lambda = 904$ nm). A irradiação tinha a duração de vinte minutos e os indivíduos foram tratados três vezes por semana, durante doze semanas. Os pesquisadores revelaram redução das úlceras, aumento do tecido epitelial, redução da dor e aumento da rede capilar. Este último achado é um dos principais fatores para obter-se sucesso no tratamento de úlceras, uma vez que a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) possibilita um fornecimento de oxigênio e nutrientes mais adequado para atender às necessidades da fase proliferativa do processo de reparo tecidual (Kitchen e Bazin, 1998).

Com auxílio da avaliação por imagem de ressonância magnética, Schaffer et al. (2000) notaram um aumento significativo do fluxo sanguíneo da microcirculação da planta do pé, quando esta região foi irradiada com

laser de baixa potência ($\lambda = 780 \text{ nm}$, irradiância de 100 mW/cm^2 , densidade de potência de 5 J/cm^2), sem haver alteração da temperatura local, que foi avaliada através de dispositivos termossensíveis alocados na região corporal avaliada naquela oportunidade.

Vários estudos experimentais indicam que a administração exógena de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que é um fator de crescimento relacionado a angiogênese e ao aumento da permeabilidade vascular (Flamme et al., 1995; Hippenstiel et al., 1998), pode induzir angiogênese regional e favorecer a sobrevivência dos retalhos cutâneos (Padubidri e Browne, 1996; Li et al., 2000).

Schindler (1998) relata que o laser de baixa potência acelera o processo de reparação celular endotelial por promover angiogênese. Almeida-Lopes et al. (2001) refere que há também o aumento na síntese de fatores de crescimento que favorecem a proliferação de queratócitos. A liberação de fatores de crescimento e a epitelização precoce também são favorecidos pela irradiação laser (Schindler, 1998).

Alguns autores acreditam que os radicais livres são importantes mediadores da isquemia, favorecendo a destruição tecidual. Eles podem participar de reações em cadeia e causarem peroxidação das membranas celulares e das proteínas intracelulares, resultando em lesões celulares irreversíveis (Aikens e Dix, 1991; Almeida-Lopez, 2001; Zhang et al., 2003). Segundo Stadler et al. (2000), o laser de baixa potência ativa a liberação de SOD (superóxido dismutase), auxiliando na inibição da ação dos radicais

livres. Sendo assim, estas podem ser algumas das justificativas para os resultados obtidos neste estudo.

É necessário que mais estudos em relação a este tema possam ser feitos, já que os resultados clínicos dependem de um grande número de variáveis como comprimento de onda, duração do pulso, irradiância, densidade de energia, frequência de emissão das ondas, tempo de tratamento e combinação entre estes fatores.

Além disso, pode-se destacar a necessidade da realização de estudos para a compreensão dos mecanismos de ação deste recurso em tecidos biológicos, além de uma normatização dos protocolos utilizados por pesquisadores que trabalham com laser, pois a literatura nos mostra uma infinidade de estudos relacionados ao tema, já que, na grande maioria, faltam dados sobre o tipo de laser, comprimento de onda, frequência de emissão, densidade de potência e densidade de energia, o que gera incapacidade para a comparação dos dados.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se neste estudo que o laser de baixa potência ($\lambda = 670 \text{ nm}$) foi eficaz no incremento da viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos, quando irradiado com densidade de energia de $20,36 \text{ J/cm}^2$.

8. ANEXO

ANEXO

Tabela 3 - Dados descritivos dos pesos dos animais

Ratos	G1 - Peso (g)	G2 - Peso (g)	G3 - Peso (g)	G4 - Peso (g)
R1	354	355	358	357
R2	345	326	347	290
R3	348	351	347	310
R4	320	268	317	357
R5	253	283	251	256
R6	267	340	269	271
R7	288	268	270	301
R8	272	259	270	277
R9	260	263	263	271
R10	275	281	278	272
Média	298,2	299,4	297,0	296,2
SD	39,5	38,9	40,8	35,7
SEM	12,491	12,301	12,902	11,289

G1=G2=G3=G4 (p = 0,9979 – não significativo pela Análise de Variância – ANOVA)

R = rato

SD = desvio padrão

SEM = erro padrão

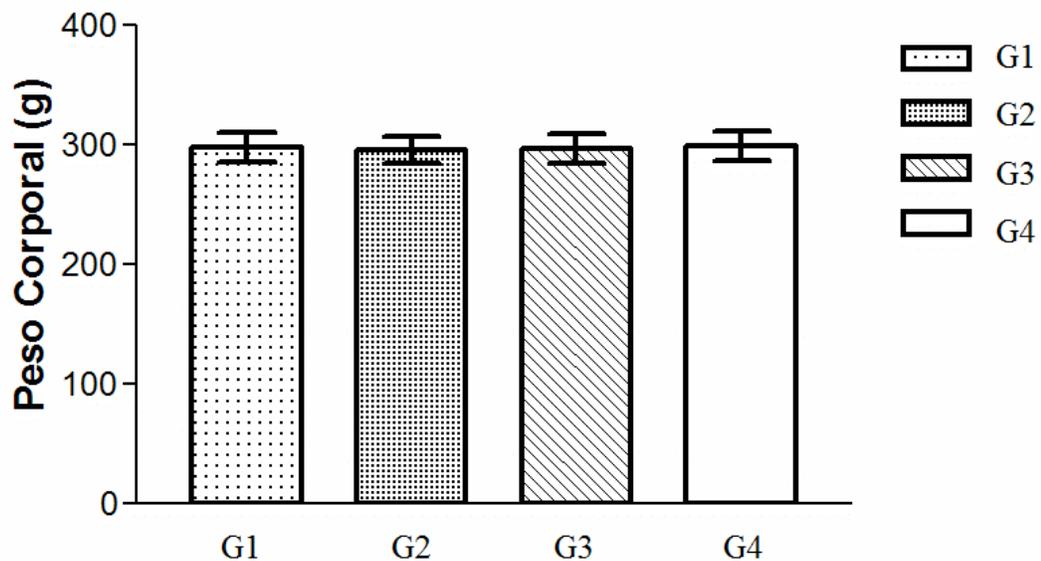


Figura 9: Gráfico com os valores médios dos pesos corporais dos ratos de cada grupo

Foi realizada a Análise de Variância ANOVA, obtendo-se um nível descritivo de 0,9979, indicando os grupos não diferem quanto ao peso dos animais.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- Aikens J, Dix TA. Peroxy radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(23): 15091-8.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg. Med.* 2001. 29(2): 179-84.
- Amir A, Solomon AS, Giler S, Cordoba M, Hauben DJ. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br. J. Plast. Surg.* 2000. 53: 58-62.
- Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 1987. 79: 990-7.
- Asai S, Fukuta K, Torii S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. *Ann Plast Surg.* 1997. 38(5): 514-7.
- Atalay C, Koçkaya EA, Çetin B, Kismet K, Akay MT. Efficacy of topical nitroglycerin and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of random-pattern skin flaps in rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.* 2003. 37: 10-3.
- Averbeck A, Fukuta K, Torii S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. *Annals of Plastic Surgery.* 1997. 38: 514-7.
- Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. 1994. Churchill Livingstone.
- 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.* 1992. 72: 483-491.

- Benedicenti A, Verrando M, Cherlone F, Brunetti O. Effect of 904 nm laser on microcirculation and arteriovenous circulation as evaluated using telethermography imaging. *Parodontol. Stomatol.* 1984. 23 (2): 167-78.
- Czernicki J, Radziszewski K, Talar J. Effect of laser biostimulation on leg blood flow in the course of arteriosclerosis. *Pol. Tyg. Lek.* 1994. 49: 363-5.
- Davis ER, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch. Facial Plast. Surg.* 1999. 1: 27-32.
- De Bie RA, De Vet H, Lenssen TF, Wildenberg F, Kootstra G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1998. 79: 1415-20.
- Duarte SI, Gomes HFC, Ferreira LM. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. *Can. J. Plast. Surg.* 1998. 6: 93-7.
- Dyson M, Young S. The effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med. Sci.* 1986. 1: 125-30.
- Ferreira LM. Retalhos cutâneos. In: Manual de cirurgia plástica. São Paulo. Ed. Atheneu. 1995. 45-62.
- Finseth F, Adelberg MG. Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. *Plast Reconstr Surg.* 1978. 61(5):738-43.
- Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, 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.* 1995. 1(2): 399-414.

Ghali L, Dyson M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. In: Steiner R, Weisz PB, Langer R. *Angiogenesis key principles science technology medicine*. Birkhäuser: *Basel*. 1992. 411-4.

Gherardini G, Gürlek A, Evans GRD, Milner SN, Matarasso A, Wassler M, Jernbeck J, Lundeberg T. Venous ulcers: improved healing by iontophoretic administration of calcitonin gene-related and vasoactive intestinal polypeptide. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998. 101: 90-3.

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

Gomes, HFC, Landman MRL, Ferreira LM. Effect of nicotine in randomized skin flaps in rats. *Rev. Hosp. São Paulo – Esc. Paul. Med.* 1994. 5: 13-17.

Gomes HFC, Bueno P, Percario S, Landman Ferreira LM. Effects of N-acetylcysteine in a random skin flaps after administration of nicotine, in the rats. *F Méd.* 1988. 117: 209-11.

Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998. 274(5 Pt 1): L678-84.

Horibe EM, Ferreira LM. Avaliação do efeito do EGB 761 na necrose do retalho cutâneo dorsal em ratos. In: *Anais do VII Congresso de Iniciação Científica*, 1999. p. 145.

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

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

Jansen G, Törkvist L, Löfgren O, Rauld J, Lundeberg T. Effects of calcitonin gene-related on tissue survival blood flow and neutrophil recruitment in experimental skin flaps. *British Journal of Plastic Surgery.* 1999. 52: 299-303.

Jurell G, Jonsson CE. Increased survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. *Scand. J. Plast. Surg.* 1976. 10: 169-72.

Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Oshiro T, Fujino T. Effects of low powered diode lasers in flap survival. *Ann. Plastic Surg.* 1985. 14: 278-83.

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

Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1983. 72: 766-77.

Kitchen S, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. 10ª ed. São Paulo: *Manole*, 1998. 191-210.

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

Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard J. (). Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischemic musculocutaneous flaps. *Acta Physiol. Scand.* 1988a. 134: 95-9.

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.* 1979. 13: 377-80.

Kubota, J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial patterns flaps in the rat model. *Lasers Med. Sci.* 2002. 17: 146-53.

Kubota J, Oshiro T. The effects of diode lasers low reactive-level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. *Laser Ther.* 1989. 1: 127-35.

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

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

Liebano RE, Ferreira LM, Neto MS. The effect of trans-cutaneous electrical nerve stimulation on the viability of random skin flaps in rats. *Cand. J. Plast. Surg.* 2002. 10: 151-4.

Lucas C, Stanborough RW, Freeman CL, De Haan RJ. (). Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. *Lasers Med. Sci.* 2000. 15: 84-93.

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

Mester AF, Mester A. Wound healing: a review. *Laser Ther.* 1989. 1: 7-16.

Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisioterapia Brasil*. 2001. 4: 221-240.

Oshiro T, and Calderhead, R.G. Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J. Clin. Laser Med. Surg*. 1991. 9(4): 267-75.

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

Ranne JO, Lähteenmäki PT, Vaalasti A, Waris TH, Lindholm TS. Adequate blood flow is essential for reinnervation in neurovascular skin flaps. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg*. 1997. 33: 7-12.

Salmi AM, Hong C, Futrell JW. 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. Surg*. 1999. 33: 163-7.

Santos LLR, Ferreira LM, Castilho HT, Hochberg J. Vitamine C effect on flap necrosis – An experimental study in rats. In: Abstracts Plastic Surgery Forum. 1999. p. 334-6.

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

Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer PM, Busch M, Reiser M, Dühmke E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J. Photochem. Photobiol. B. Biol*. 2000. 54: 55-60.

Schindl A, Schindl L. Systemic increase in blood flow in conditions of disturbed microcirculation after low power laser irradiation. In: Jori G, Karu T. Proc. low power laser light on biological system II, Vienna, Austria, SPIE Proc. 1996. 2929: 63-9.

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

Schindler A. Increased dermal neovascularization after low dose laser therapy. 2nd Congress, World Association for Laser Therapy. Kansas City. 1998.

Smith JD, Pribaz JJ. Flaps. In: Eriksson E. Plastic Surgery. Indications, Operations and Outcomes – vol 1. 2000. Mosby.

Smith RJ. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plast. Reconstr. Surg.* 1992. 89: 306-10.

Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, Lanzafame RJ. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg. Med.* 2000. 27(3): 255-61.

Suárez Nieto C, Suarez Garcia MJ, Barthe Garcia P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* 1992. 45:113-6.

Sugrue ME, Carolan J, Leen EJ. The use of infra-red laser therapy in the treatment of venous ulcerations. *Annals of Vascular Surgery.* 1990. 4: 179-81.

Ugland O. Flaps and flap necrosis. *Acta Chir. Scand.* 1966. 131: 408-12.

Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1998. 16: 159-65.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Laser Surg. Med.* 1997. 20: 56-63.

Zhang D, Zhout Y, Xiao B, Li G. The effect of postoperative irradiation with low incident level of CO₂ laser irradiation on skin flap survival and the possible mechanisms. *Laser Ther.* 1992. 4: 75-9.

Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, Angel MF, Lineaweaver WC. 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.* 2003. 56(7): 653-9.