

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA- PPG-Ft

**Análise dos efeitos do tratamento preemptivo com terapia por
fotobiomodulação a laser (660 nm) na viabilidade de retalho cutâneo em
ratos**

CINTIA CRISTINA SANTI MARTIGNAGO

SÃO CARLOS – SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA - PPG-Ft

**Análise dos efeitos do tratamento preemptivo com terapia por
fotobiomodulação a laser (660 nm) na viabilidade de retalho cutâneo em
ratos**

CINTIA CRISTINA SANTI MARTIGNAGO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisioterapia na área de concentração em Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto (UFSCar)

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini

São Carlos- SP, 2019

Martignago, Cintia Cristina Santi

Análise dos efeitos do tratamento preemptivo com terapia por fotobiomodulação a laser (660 nm) na viabilidade de retalho cutâneo em ratos / Cintia Cristina Santi Martignago. -- 2019.
91 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Nivaldo Antonio Parizotto

Banca examinadora: Thiago Luiz de Russo, Fernanda de Freitas Anibal, Elaine Calderia de Oliveria Guirro, José Carlos Tatmatsu Rocha

Bibliografia

1. Retalho Cutâneo Randômico. 2. Terapia por Fotobiomodulação. 3. Angiogênese. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Romildo Santos Prado – CRB/8 7325




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Cintia Cristina Sant' Martinago, realizada em 15/03/2019.



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Paizoto
UFSCar




Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
UFSCar



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar



Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guim
USP



Prof. Dr. João Carlos Tatmatsu Rocha
UFC

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001 e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** processo 2015/13501-3.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família que durante esses últimos anos respeitaram a minha ausência, falta de paciência e aguentaram o meu mau humor sem nunca deixar de me incentivar e me acolher quando tudo dava errado, sempre me apoiando na busca pelo alcance dos meus objetivos.

AGRADECIMENTO

É bom chegar ao final dessa etapa e ver o tamanho da lista de pessoas que me auxiliaram no decorrer desse processo e que merecem ser lembradas:

Inicialmente agradeço a Deus, pois o Senhor guiou os meus passos, me trouxe e me manteve aqui. Sem sua presença tão marcante em minha vida não teria conseguido. Agradeço a Ele pelos “anjos” em forma de pessoas que colocou ao meu lado durante todo esse tempo.

A **Janete Teresinha Santi**, minha mãe, por nunca ter desistido de mim e ter acreditado em meu potencial quando nem eu mesmo acreditava, por ter tentado me manter calma mesmo quando não entendia nada do que eu falava, por ter feito dos meus objetivos os seus e não mediu esforços para que eu conseguisse alcançá-los. Por me ensinar a sempre olhar pra cima e me manter forte. Ao meu pai **Iris Martignago**, (*in-memóriam*) que apesar da ausência terrena, cuida de mim e direciona os meus passos.

Ao **Vô Dino** e a **Vó Nene**, por serem meu porto seguro e estarem sempre ao meu lado. Vocês sempre serão muito mais que avós.

Aos meus tios **Gilberto, Jussara e Alessandro** e seus “agregados”, pois não sei o que seria de mim sem vocês. Saber que vocês sempre me apoiariam me deu segurança para seguir em frente.

As minhas primas **Tairini, Sarah, Ellen e Gabriela**. Espero um dia poder ensinar a vocês um pouco do que me ensinaram, mesmo sem saber.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto**, por abrir as portas do seu laboratório, me acolher em sua equipe e acreditar em meu trabalho. Obrigada pela paciência, pelos grandes ensinamentos científicos e de vida, pela sua sabedoria e otimismo. Um exemplo a seguir.

As minhas companheiras de horas e horas de experimento, **Carla Roberta Tim, Patrícia Brassolatti** e **Ana Laura de Andrade**. Muito obrigada pela paciência, dedicação, comprometimento, disponibilidade e o bom humor durante as longas horas de experimento. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria sido realizado.

A minha família São Carlense: **Bianca Rantim** e **Mikaela Corrêa**. Elas poderiam ter sido apenas duas colegas de apartamento durante esses 4 anos, mas foram muito mais que isso. Foram responsáveis por fazer que a saudade da família diminuísse, que as dificuldades parecessem ser menores e que os momentos de desabafos e desesperos no final de um dia de trabalho acabassem em risadas.

As amigas que o doutorado me proporcionou: **Carla Roberta Tim, Livia Assis, Érika Rampazo** e **Ana Laura Andrade**. Quem diria que eu conseguiria conquistar amizade de pessoas com personalidades tão diferentes e tão marcantes, mas com uma característica em comum, um coração gigante. Vocês me acolheram, acalmaram, apoiaram e me ajudaram a descobrir quem eu

realmente sou. Espero ter consigo ser para vocês um pouco do que foram para mim durante esses anos, saibam que sempre poderão contar comigo.

Ao meu namorado **Rogério Erbereli**, que me conheceu na fase mais conturbada do doutorado, e mesmo assim não mediu esforços para me ajudar na conclusão dessa etapa, me apoiando e estando ao meu lado quando nem eu me aguentava.

A todos os meus **amigos e familiares** que souberam respeitar o meu distanciamento nesses anos, sem nunca cobrar minha ausência, mas sempre estando por perto para me recepcionar e me acolher nas poucas e rápidas ida para casa. O acolhimento de vocês foi o melhor descanso para a minha mente e para o meu corpo, além de fazer com que as longas horas de viagem, nem fossem tão cansativas assim.

Sou grata a todos os alunos que fizeram parte do **Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Federal de São Carlos** ao longo desses 4 anos, pois todos contribuíram de alguma maneira, não apenas para a realização desta obra, mas também por me proporcionarem ensinamentos que levarei para a vida.

A todos os **alunos de Iniciação Científica** que passaram pelo laboratório, em especial ao **Bruno Batista** que me auxiliou nas contagens de vasos e mastócitos. Ver seu crescimento acadêmico nesse período é gratificante.

Agradeço as prof. **Dra Tatiana Sato** e a **Vivian Cury** que não apenas participaram de minha banca de qualificação como também fizeram contribuições importantíssimas para o aprimoramento desta pesquisa.

Aos professores **Msc. Carlos Eduardo dos Santos Castro** e **Dr. Richard Eloin Liebano** que gentilmente me acolheram em suas disciplinas, e assim me auxiliaram no processo de capacitação em docência. Vocês sempre estiveram dispostos a esclarecer ou “semear” dúvidas. Minha admiração por vocês é enorme.

Obrigada a professora **Dra. Ana Cláudia de Minuz Renno** e todos os integrantes de seu laboratório na UNIFESP (Campus Baixada Santista) por me acolherem e me auxiliarem na realização de algumas análises do experimento.

Ao professor **Dr. Thiago Russo** e a toda a sua equipe do Laboratório de Imunohistoquímica e Biologia Molecular que sempre estiveram dispostos a ajudar e a compartilhar o conhecimento.

A **Dra. Paula Aiello**, que se disponibilizou e me auxiliou sempre com muita paciência e dedicação.

Ao meu coorientador, **Dr. Paulo Sergio Bossini**, por todo o apoio dedicação e paciência principalmente no início dessa pesquisa, quando além de tudo ainda ouvia minhas lamentações pessoais.

A professora **Dr. Lucimar Retto da Silva de Avó**, por compartilhar seu conhecimento sobre o tecido cutâneo.

Ao professor **Dr. Ricardo Borra** e a sua equipe de trabalho do Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética da UFSCar que permitiram que eu utilizasse o scanner de Lâminas.

À toda **equipe da DMC** por me fornecerem o equipamento laser durante toda a pesquisa.

A técnica de laboratório **Teresa Fatori Piassi**, que sempre esteve disposta a me ajudar.

A todos os **professores do Departamento de Fisioterapia** que contribuíram para minha formação, e sempre estiveram dispostos a me auxiliar quando necessário.

Aos professores: **Dr. Carlos Eduardo Pinfildi, Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro; Dra. Fernanda de Freitas Anibal; Dr. José Carlos Tatmatsu Rocha, Dra. Raquel Aparecido Casarotto, Dra. Tatiana Sato e Dr. Thiago Luiz Russo** que aceitaram o convite como membros da minha banca. As preciosas sugestões propostas serão com certeza de grande valia para a execução final deste trabalho.

A todos os **funcionários de Departamento de Fisioterapia** por estarem sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar. Em especial **a Iolanda da Silva Vilela**, a alegria do Departamento, sempre disposta a nos acalmar e a recepcionar a todos não só com um café, mas com um sorriso contagiante em seu rosto.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio dado ao presente trabalho.

Em especial, á **Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de estudo concedida (2015/13501-3).

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, pois fizeram parte do meu crescimento intelectual, espiritual e pessoal durante esses 4 anos.

*“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido,
mas aquele que vai acompanhado vai mais longe...”*

Clarice Linspector

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Você escolhe, recolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica tudo aquilo que te rodeia a existência. Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes. São as fontes de atração e repulsão na jornada da tua vivência. Não reclame, nem se faça de vítima. Antes de tudo analisa e observa. A mudança está em suas mãos. Reprograme a sua meta, busque o bem e você viverá melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

O retalho cutâneo (RC) é uma técnica utilizada na cirurgia plástica há muitos anos com o intuito de reparar grandes lesões de pele seja devido a traumas ou após procedimentos operatórios, no entanto, apresenta como complicação a necrose tecidual. Um tratamento que apresenta comprovação científica para a diminuição da necrose do RC é a terapia por fotobiomodulação (TFBM). Devido ao número de parâmetros envolvidos na dosimetria dessa terapêutica, algumas lacunas ainda existem na literatura. Sendo assim os objetivos desse trabalho foram; encontrar o melhor local de aplicação com o mesmo tempo de irradiação e investigar os efeitos do tratamento preemptivo associado ao tratamento pós-operatório com TFBM com diferentes doses na viabilidade em RC em ratos. Para isso foram utilizados 81 ratos (*Rattus norvegicus*), machos divididos em dois estudos. No primeiro estudo, 18 animais foram aleatorizados em três grupos. O grupo I (GI) simulação da TFBM, o grupo II (GII) TFBM em três pontos na base cranial do RC e o grupo III (GIII) TFBM em doze pontos no interior do RC. Os animais do GII apresentaram menor área da necrose e maior quantificação do colágeno quando comparado com o grupo controle. Concluiu-se que a aplicação da TFBM em três pontos na base cranial do RC foi a mais eficiente. No segundo estudo, 63 ratos foram randomizados em cinco grupos: Grupo Controle (GC): simulação da TFBM; Grupo preemptivo + laser 1,1J (GP1): TFBM preemptivo com 1,1J de energia por ponto; Grupo preemptivo + laser 4J (GP4): TFBM preemptivo com 4J de energia por ponto; Grupo 1 (G1): TFBM imediatamente após a cirurgia com 1,1J de energia por ponto; Grupo 4 (G4): TFBM imediatamente após a cirurgia com 4J de energia por ponto. No terceiro dia após a aleatorização os animais foram submetidos a cirurgia do RC de base cranial. Em ambos os experimentos a TFBM foi realizada com um laser de 660 nm com uma potência de 50mW. Os animais do GC, GP1 e GP4 tiveram seus tratamentos iniciados 72 horas antecedentes a cirurgia e foram subdivididos em 2 períodos experimentais, sendo o primeiro no dia da realização do RC (n= 6) e o segundo no 7^a dia pós-operatório. Na primeira avaliação foi possível encontrar maior número de vasos, mastócitos e maior expressão do FGF e VEGF no GP1 comparado ao GC e maior expressão desses mesmos fatores no GP4 comparado ao GC. Na segunda avaliação o GP1 apresentou melhores resultados quando comparado ao GC na maioria das análises realizadas. Assim este estudo demonstra que o tratamento preemptivo com a TFBM com a aplicação de 1,1J de energia por ponto foi eficaz na melhora do RC.

Palavras chave: Retalho Cutâneo Randômico; Terapia por Fotobiomodulação; Período Pré-operatório e Angiogênese.

ABSTRACT

Skin flap (SF) is a technique used in plastic surgery for many years to repair large lesions of the skin either due to trauma or after operative procedures, however, it presents as a complication tissue necrosis. A treatment that presents scientific evidence for the reduction of SF necrosis is photobiomodulation therapy (TFBM). Due to the number of parameters involved in the dosimetry of this therapy, some gaps still exist in the literature. Thus the objectives of this work were; find the best site of application with the same irradiation time and investigate the effects of preemptive treatment associated with postoperative treatment with TFBM at different doses on viability in SF in rats. For this, 81 rats (*Rattus norvegicus*), males divided in two studies were used. In the first study, 18 animals were randomized into three groups. Group I (GI) simulation of TFBM, group II (GII) TFBM in three points in the cranial base of the SF and group III (GIII) TFBM in twelve points inside the SF. The animals of the GII presented smaller area of the necrosis and greater quantification of the collagen when compared with the control group. It was concluded that the application of the TFBM in three points in the cranial base of the SF was the most efficient. In the second study, 63 rats were randomized into five groups: Control Group (CG): TFBM simulation; Preemptive group + laser 1,1J (GP1): preemptive TFBM with 1.1J of energy per point; Preemptive group + laser 4J (GP4): preemptive TFBM with 4J of energy per point; Group 1 (G1): TFBM immediately after surgery with 1, 1J of energy per stitch, Group 4 (G4): TFBM immediately after surgery with 4J of energy per point, and on the third day after randomization the animals underwent cranial base SF surgery. The animals of GC, GP1 and GP4 had their treatments started 72 hours prior to surgery and were subdivided into 2 experimental periods, the first being on the day of SF. In the first evaluation it was possible to find a higher number of vessels, mast cells and greater expression of FGF and VEGF in GP1 compared to CG and higher expression of these same factors in GP4 compared to GC. In the second evaluation GP1 showed better results when compared to GC in the majority of analyzes. Thus, this study demonstrates that preemptive treatment with TFBM with the application of 1.1J of energy per point was effective in improving SF.

Keywords: Skin flap; Photobiomodulation Therapy; Preoperative Period and Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Contextualização

- Figura 1-** Profundidades de penetração tecidual relacionados aos vários comprimentos de onda (de 180 a 1100 nm), entre o ultravioleta ao infravermelho próximo. Nota-se que as maiores profundidades estão na faixa do vermelho e infravermelho próximo.23
- Figura 2-** Mecanismo esquemático de ação de fotobiomodulação com comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo, caracterizando a ação mitocôndria e na membrana celular.25

Estudo I

- Figura 1-** Imagem representativa do molde plástico utilizado para a padronização dos pontos de irradiação com a FBM a laser nos diferentes grupos.46
- Figura 2 -** Representação gráfica dos resultados referente as variáveis % de área de necrose e colágeno total nos diferentes grupos irradiados.51
- Figura 3-** Demonstração gráfica dos escore Imunoistoquímico e fotomicrografia representativa dos marcadores avaliados nos diferentes grupos.53

Estudo II

- Figura 1-** Esquema representativo da divisão dos animais nos diferentes grupos e nos diferentes períodos experimentais.64
- Figura 2 -** Fotomicrografia representativa de vaso e mastócito na primeira e segunda avaliação nos diferentes grupos avaliados 69
- Figura 3 -** Gráfico representativo dos resultados da comparação entre os grupos para a variável área da necrose..... 70
- Figura 4-** Fotomicrografias representativa das análises de Imunoistoquímica do tecido cutâneo dos grupos experimentais na primeira avaliação 71
- Figura 5 -** Fotomicrografias representativa dos grupos experimentais na segunda avaliação 73

LISTA DE TABELAS

Contextualização

Tabela 1- Descrição dos parâmetros e doses de irradiação da TFBM. 23

Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados em pesquisas com TFBM em RC..... 31

Estudo 1

Tabela 1- Parâmetros de tratamento com FBM a laser47

Estudo II

Tabela 1- Parâmetros de Irradiação com TFBM a laser nos diferentes grupos.....64

Tabela 2- Especificações dos anticorpos utilizados na imunistoquímica.....67

Tabela 3-Resultados da primeira avaliação68

Tabela 4 - Resultados da segunda avaliação72

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosina trifosfato
CCO: Citocromo c oxidase
FBM: Fotobiomodulação
FGF: Fator de crescimento de fibroblasto
G1: Grupo laser 1J
G4: Grupo laser 4 J
GC: Grupo controle
GI: Grupo controle
GII: Grupo irradiado em três pontos
GIII: Grupo irradiado em doze pontos
GP1: Grupo preemptivo + laser 1,1J
GP4: Grupo preemptivo + laser 4J
HIF-1 α : Fator indutor de hipóxia um alfa
LED: Diodo emissor de luz
LLLT: Terapia a laser de baixa intensidade
NO: Óxido nítrico
RC: Retalho cutâneo
TC: Tecido cutâneo
TFBM: Terapia por fotobiomodulação
TGF β : Fator crescimento transformador
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
%: Porcentagem
cm²: Centímetros quadrado
J/cm²: Joule por centímetro quadrado
J: Joules
mg/kg: Miligramas por kilo
mW: Miliwatts
nm: Nanometros
s: segundos

W/cm^2 : Wats por centímetro quadrado

W: Wates

SUMÁRIO

1.CONTEXTUALIZAÇÃO	20
1.1Terapia por Fotobiomodulação	22
1.1.1Definição e Características da Terapia por Fotobiomodulação	22
1.1.2 Mecanismos de ação da FBM	24
1.1.3 Parâmetros da FBM.....	25
1.3 TFBM no Tecido Cutâneo	26
1.4 Retalho cutâneo.....	27
1.5 Terapia por Fotobiomodulação em retalho cutâneo	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35
4. ESTUDO I.....	42
RESUMO.....	44
4.1 INTRODUÇÃO	45
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.2.1. Delineamento experimental.....	46
4.2.2. Procedimento operatório	47
4.2.3 Protocolo da fotobiomodulação à laser	47
4.2.4 Análises	48
4.2.5 Método de determinação da porcentagem da área de necrose dos retalhos	48
4.2.6 Eutanásia dos animais	48
4.2.7 Coleta da amostra da pele e preparação para a análise histológica.	48
4.2.8 Análise Histológica descritiva.....	49
4.2.9 Quantificação das fibras de colágenos	49
4.2.10 Análise de Imunoistoquímica.....	49
4.2.11 Análise estatística.....	50
4.3 RESULTADOS	50
4.3.1Área da Necrose	50
4.3.2 Descrição Morfológica.....	51
4.3.2 Quantificação das Fibras de Colágeno	51

4.3.3 Expressão de TGF- β	51
4.3.4 Expressão FGF	52
4.4 Discussão	52
4.5 Conclusão.....	55
4.6 Agradecimentos	55
4.7 Referência Bibliográfica	55
5. ESTUDO II.....	59
RESUMO.....	61
5.1 INTRODUÇÃO	62
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.2.1 Delineamento experimental.....	63
5.2.3 Terapia por fotobiomodulação a laser.....	63
5.2.4 Procedimento operatório	65
5.2.5 Eutanásia dos animais	65
5.2.6 Preparação do material para análises	65
5.2.7 Análises	66
5.2.8 Cálculo da Área de Necrose dos Retalhos	66
5.2.9 Morfometria de Mastócitos e de Vasos Sanguíneos	66
5.2.10 Imunoistoquímica.....	66
5.2.11 Análise estatística.....	67
5.3 RESULTADOS	68
5.3.1 Primeira Avaliação	68
5.3.1.1 Morfometria de mastócitos e de vasos	68
5.3.1.2 Expressão Proteica por Imunoistoquímica.....	69
5.3.2 Segunda Avaliação	69
5.3.2.1 Área da Necrose	69
5.3.2.2 Morfometria de mastócitos e de vasos	70
5.3.2.3 Expressão Proteica por Imunoistoquímica.....	72
5.4 DISCUSSÃO	74
5.5 Conclusão.....	76
5.6 Agradecimentos	76
5.7 Referência Bibliográfica	76
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	81
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	83

8. ANEXOS	85
ANEXO I	86
ANEXO II	87
ANEXO III	89
ANEXO IV	90

APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa foi realizada sobre a orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, no Laboratório de Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, com bolsa de estudo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2015/13501-3.

Esse trabalho foi estruturado conforme as normas complementares nº 002/2006 do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPGft) que possibilita a apresentação da tese em formato do artigo. Sendo assim, esse trabalho está redigido em 4 partes.

Na primeira parte além dos elementos pré-textuais é apresentado uma contextualização sucinta e atualizada sobre os temas abordados na obra, seguida dos objetivos gerais e específicos da mesma.

Na segunda parte é apresentado o primeiro artigo, o qual é intitulado “*Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats*” e foi publicado (*online*) na revista *Lasers in Medical Science*. Nele buscamos encontrar qual seria o melhor local para aplicação da TFBM além de esclarecer se a maneira como um mesmo tempo de irradiação é entregue ao tecido interfere na viabilidade do RC.

Na sequência apresentamos o segundo artigo, que foi submetido para a avaliação na revista “*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*” intitulado “*Preemptive treatment with laser photobiomodulation therapy in the skin flap viability*”. Neste estudo buscamos elucidar se a aplicação da TFBM a laser previamente a realização do RC auxiliaria na prevenção dos casos de necrose em retalhos cutâneos.

A quarta e última parte desta tese é composta pelas considerações finais e conclusão, perspectivas futuras, anexos e apêndice.

1.CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Terapia por Fotobiomodulação

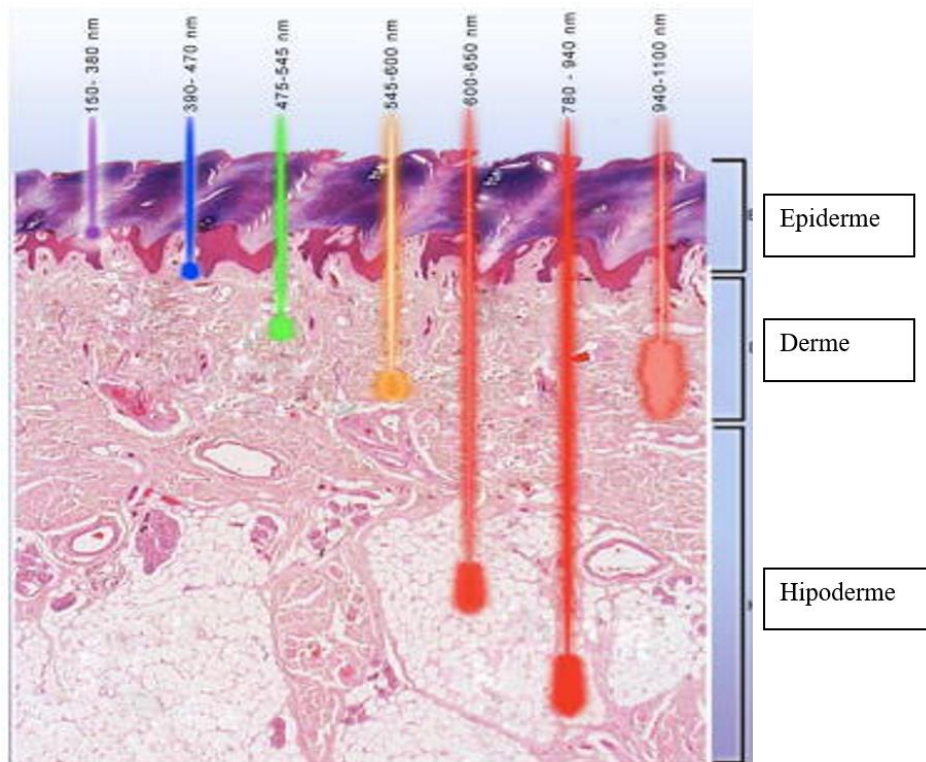
1.1.1 Definição e Características da Terapia por Fotobiomodulação

No decorrer de cinco décadas de estudos na área de laserterapia, muitos termos já foram utilizados para designar a interação da energia luminosa com os tecidos biológicos sendo os mais conhecidos: bioestimulação a laser, terapia a laser de baixa potência (para indicar a diferença de lasers de alta potência utilizados na medicina), terapia laser de baixa intensidade (LLLT), laser de baixa energia, fototerapia, fotobioestimulação, terapia a luz e terapia a laser (2). Devido aos avanços tecnológicos que ocorreram na área, viu-se a necessidade de criar um termo mais claro e abrangente, pois constatou-se que não é necessário usar um laser monocromático e coerente para obter efeitos biológicos benéficos, uma vez que, diodos emissores de luz (LEDs) não coerentes, com parâmetros comparáveis aos lasers têm efeitos similares (3). Sendo assim, em 2014, em um consenso internacional com estudiosos da área de laserterapia optou-se por, utilizar o termo: terapia por fotobiomodulação (TFBM) (4).

A TFBM pode ser definida como o uso de fontes de luz não ionizantes com finalidade terapêuticas, incluindo lasers, LEDs e luz de banda larga, no espectro visível e invisível. Trata-se de um processo atômico que envolve cromóforos endógenos desencadeando eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo gera resultados terapêuticos benéficos, dentre os quais podemos destacar a analgesia, modulação do processo inflamatório, imunomodulação e regeneração de tecidos (4). O termo TFBM pode ser abreviado para fotobiomodulação (FBM), quando se é relatado apenas os processos de modulação e não a terapia (5).

Nos primeiros lasers estudados, a luz era emitida no espectro vermelho, sendo os mais conhecidos: o laser de rubi (694 nm) e o de Hélio e Neônio (632,8 nm). Com o avanço dos estudos no campo da FBM constatou-se que existe um comprimento de onda adequado a profundidade que se pretende tratar, sendo possível encontrar equipamentos com comprimentos de onda que variam de 390 a 1.100 nm, emitem a energia eletromagnética de maneira contínua ou pulsada. Sabe-se que quanto maior o comprimento de onda em uma faixa específica, maior será a sua profundidade de atuação, como pode ser visto na figura 1 (6).

Figura 1- Profundidades de penetração tecidual relacionados aos vários comprimentos de onda (de 180 a 1100 nm), entre o ultravioleta ao infravermelho próximo. Nota-se que as maiores profundidades estão na faixa do vermelho e infravermelho próximo.



Fonte:BAROLET, D. et al. (7) modificada.

Além do comprimento de onda, existem outras características da FBM que devem ser levadas em consideração para se compreender melhor o seu mecanismo de ação e sua interação com os tecidos biológicos sendo que as principais estão descritas resumidamente na tabela 1(8).

Tabela 1- Descrição dos parâmetros e doses de irradiação da TFBM.

continua

Parâmetros	Unidade de medida	Descrição
Comprimento de onda	Nm	A luz é uma forma eletromagnética de energia com um comportamento semelhante a uma onda. Seu comprimento de onda é medido em nanômetro (nm)
Potência	W	Taxa pela qual a energia é transformada
Irradiância	W/cm ²	Também pode ser chamado de densidade ou intensidade de potência. Corresponde à potência (W) dividida pela área do feixe (cm ²)
Estrutura do Pulso	Potência de pico (W) Largura de pulso (s) Ciclo de trabalho (%)	Quando pulsado deverá ser calculado a potência média (PM) da seguinte maneira: PM (W)= potência de pico (W) x largura do pulso (s)X frequência de pulso (Hz)

Tabela 1- Descrição dos parâmetros de irradiação e dose da TFBM.

Continuação

Coerência	O comprimento da coerência depende da largura da banda espectral	Temporal: inicialização e finalização simultânea de todas as ondas Espacial: as ondas com coerência temporal encontram-se em planos espaciais paralelos entre si.
Polarização	Polarizado linear ou polarizado circular	Sabe-se que a luz polarizada perde a sua polaridade em meios altamente dispersivos, tais como tecido biológico, pelo que esta propriedade não é considerada muito frequente nos efeitos da FBM.
Energia	Joules (J)	Não deve ser confundida como dose, pois pressupões reciprocidade (relação inversa entre potência e tempo. É calculada como Energia (J)=Potência (W) X Tempo (s)
Densidade de energia	J/cm ²	É um importante descritor de dose, mas pode não ser confiável quando considerado que ele pressupõe uma relação de reciprocidade entre irradiância e tempo
Tempo de irradiação	Segundos (s)	Possivelmente, a melhor maneira de prescrever e registrar a FBM seria definir os quatro parâmetros da Tabela 1 e então definir o tempo de irradiação com “dose” real.
Intervalo de tratamento	Horas, dias ou semanas	Intervalo de tempo diferentes podem resultar em resultados diferentes.

Fonte:(FREITAS; HAMBLIN; 2016) (8), modificada.

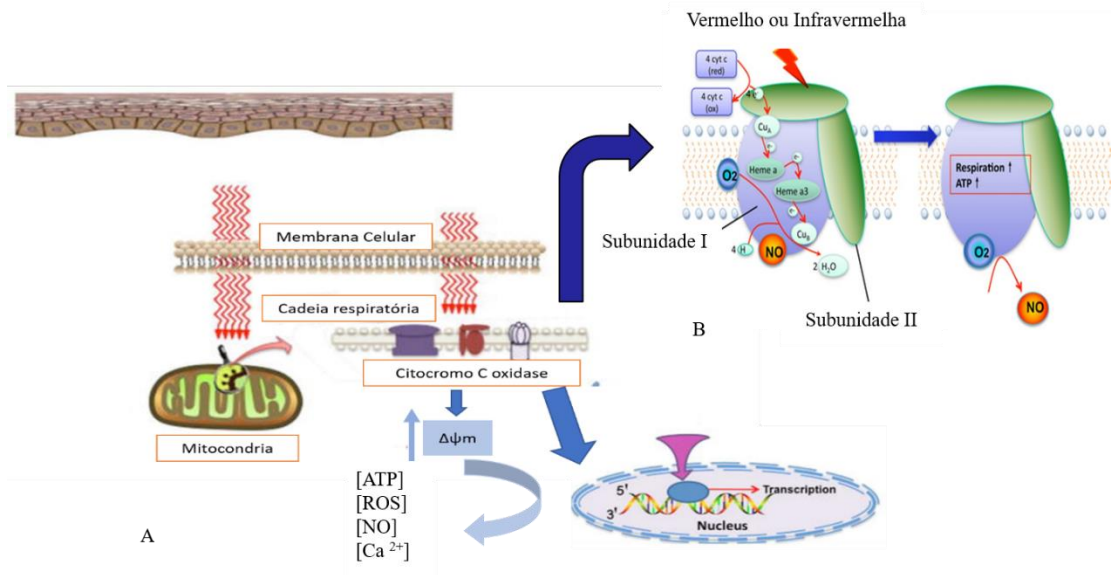
1.1.2 Mecanismos de ação da FBM

Desde os primeiros registros da ação terapêutica da FBM na década de 60, muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de compreender melhor a interação da luz com os tecidos biológicos. Sabe-se que o mecanismo biológico básico por trás dos efeitos da FBM seja a absorção da luz vermelha e infravermelha pelos cromóforos mitocondriais contidos na cadeia respiratória, o citocromo c oxidase (CCO)(9,10) ou por fotorreceptores da membrana plasmática das células(6).

O CCO é a unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial, uma enzima com múltiplas subunidades que contém dois cofatores heme e dois centros cobre (cobre A e B) que podem estar em sua forma reduzida ou oxidada. O CCO transfere prótons para o oxigênio molecular para formar moléculas de água usando os elétrons do CCO reduzido. O acúmulo de óxido nítrico (NO) inibe este processo ligando-se à cobre b (figura 2B), propõe-se que a luz vermelha

ou infravermelho próximo possa dissociar este NO não covalentemente ligado, aumentando a taxa de respiração e a produção de adenosina trifosfato ATP (11).

Figura 2- Mecanismo esquemático de ação de fotobiomodulação com comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo, caracterizando a ação mitocôndria e na membrana celular.



A- principais eventos que ocorrem com a absorção de fótons e os mecanismos de transcrição e transdução ao núcleo das células B- Fotodissociação do NO a partir do citocromo c oxidase que ocorre na unidade IV da cadeia respiratória entre a membrana interna e externa da mitocôndria. ATP: adenosina trifosfato; ROS: espécies reativas do oxigênio; Ca^{2+} : do Cálcio; NO: óxido nítrico. *Fonte: Avci et al 2013 e Hamblin, M. 2018:(6),(12).*

Após a ativação do CCO ocorre uma cascata de eventos que leva ao aumento do potencial protônico da membrana mitocondrial, aumento na síntese de ATP, mudança na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), do Cálcio (Ca^{2+}) e do NO (figura 2-A) (8). Impulsionado por mudanças na estrutura da mitocôndria, ocorre também a comunicação entre a mitocôndria e o núcleo levando a alterações na síntese de ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico fenômeno esse conhecido como sinalização retrógrada da mitocôndria (13). Essas alterações celulares e moleculares levam aos efeitos terapêuticos da TFBM, dentre os quais pode-se citar o efeito analgésico, na formação de novos vasos sanguíneos, na modulação de processos inflamatórios e no reparo tecidual (3).

1.1.3 Parâmetros da FBM

Sabe-se que a escolha do protocolo de tratamento utilizado para a irradiação com FBM é de extrema importância para o sucesso da resolução do quadro clínico dos pacientes, esse é um passo complexo devido ao número de parâmetros envolvidos na escolha da dosagem do tratamento, como pode ser visto na tabela 1, onde estão descritos os parâmetros mais importantes.

É importante selecionar os parâmetros ideais para a aplicação da TFBM, pois estudos tem comprovado a existência de uma dose-resposta bifásica, que comprova que doses (fluência, irradiância, tempo de exposição ou número de repetições) muito baixas ou muito altas podem levar a nenhum efeito, ou ainda um efeito inibitório, achado esse que segue a lei de Arndt-Schultz que demonstra que o resultado do tratamento está relacionado com a dosagem utilizada (14,15).

Pesquisas realizadas com a TFBM demonstraram que quando esse tratamento é aplicado com os parâmetros adequados este tem se mostrado efeitos positivos no tratamento de disfunções de diversos tecidos entre eles: nervoso (16,17), muscular (18,19), ósseo (20,21), cutâneo (22,23) entre outros.

1.3 TFBM no Tecido Cutâneo

O tecido cutâneo (TC) é o maior órgão do corpo humano e serve principalmente como uma barreira protetora contra o meio ambiente (24), sendo considerado essencial para a segurança e manutenção da homeostasia do organismo (25). Ele é um órgão estratificado constituído por duas camadas: a epiderme, camada mais externa e composta principalmente por queratinócitos, e a derme, que contém diversas estruturas como: fibroblastos, matriz extracelular, terminações nervosas, vasos linfáticos e sanguíneos (26). O contato constante do TC com o meio externo resulta em uma maior susceptibilidade ao acometimento de diferentes tipos de lesões, o que leva ao comprometimento da integridade do tecido, que pode resultar em significativa incapacidade ou, em casos mais severos, até mesmo a morte (24).

O processo de reparo do TC é um processo complexo e multicelular, que envolve o esforço coordenado de vários tipos de células como queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e plaquetas (27). Esse processo engloba três fases distintas, que geralmente se sobrepõem no tempo: inflamação, proliferação e remodelamento (28). Embora o TC tenha a capacidade de se regenerar por si, frequentemente ocorrem situações específicas (como problemas de vascularização e presença de doenças associadas) que comprometem esse

reparo culminando no aparecimento de afecções cutâneas crônicas, com perda da integridade estrutural e funcional do tecido (29). Nesses casos, há necessidade de intervenções terapêuticas, como procedimentos cirúrgicas, tratamentos farmacológicos ou recursos eletrofísicos para auxiliar e promover o processo de reparo. Nesta perspectiva tem-se utilizado a TFBM como tratamento adjuvante no reparo do TC, devido ao fato do mesmo ser um recurso eletrofísicos que atua induzindo o aumento da atividade mitótica, no números de fibroblastos, na síntese de colágeno e neovascularização (30).

Pesquisas tem demonstrado que o TFBM tem o potencial de interagir com diversas moléculas sinalizadoras sendo algumas delas: fator indutor de hipóxia um alfa (HIF-1 α), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (1,23,31–34), fatores de crescimento ligados ao processo de angiogênese (35).

A angiogênese é uma importante fase do processo de reparo que inicia pela migração, divisão e invasão das células endoteliais, subsequente formação do lúmen e conexão dos novos segmentos vasculares com os segmentos pré-existentes (36). O VEGF e o HIF-1 α são fatores essenciais para o processo de angiogênese (8).

O HIF-1 α é uma proteína envolvida na adaptação celular à hipóxia, na presença de maiores concentrações de oxigênio é rapidamente degradado pelas enzimas dependentes de oxigênio (37) e sinaliza o aumento na produção do VEGF (35). O VEGF é um importante regulador da angiogênese fisiológica e patológica (38) que possui cinco isoformas geradas como resultado de splicing alternativo de um único gene de VEGF (39). Outro fator de crescimento que também é conhecido por estar envolvido no processo de angiogênese é o FGF (40), sua família é composta de 22 membros estruturalmente relacionados (41)

Diante do exposta a cima, a TFMB tem sido aplicada em diferentes afecções do TC sendo as mais estudadas: ferida cutânea (23,30,42,43) e pós-operatório de cirurgia plástica (31,44,45).

1.4 Retalho cutâneo

O RC pode ser descrito como a transferência de segmentos do tecido cutâneo de uma região para outra, mantendo com a primeira uma conexão vascular temporária ou definitiva (46). É um recurso utilizado frequentemente por cirurgiões plásticos em cirurgias reparadoras de perdas de tecido tanto de origem traumáticas ou após procedimentos operatórios, como

excisão de tumores, malformação congênita ou para reconstrução de estruturas faciais como orelha, nariz, lábio e testa (47,48).

A classificação do RC pode ser feita baseada em diversos aspectos, sendo as mais usadas: a classificação por composição e por suprimento sanguíneo. Quanto a sua composição o RC pode ser classificado em simples, quando tem uma única estrutura anatômica ou composto, quando tem duas ou mais estruturas anatômicas envolvidas (49). Quanto ao suprimento sanguíneo, ele pode ser classificado em randômico, quando o suprimento sanguíneo é feito através de artérias musculocutâneas localizadas ao acaso na área do pedículo, ou em axial, nos casos em que o suprimento sanguíneo é realizado por uma artéria cutânea específica localizada abaixo do eixo do retalho (50).

Embora a realização de RC seja uma técnica segura e eficiente, uma das alterações fisiológicas que ocorrem com a elevação do retalho é a redução significativa do fluxo sanguíneo devido a transecção parcial do suprimento vascular, que leva a uma redução na concentração de nutrientes para a região e pode acabar resultando em necrose da porção distal desse retalho (50).

Assim, ficou evidente a necessidade de estudos que investiguem recursos para auxiliar nesse processo cirúrgico. Desta forma, para possibilitar o estudo de estratégias de tratamento que diminuíssem a porcentagem da necrose Mc Farlane, Deyoung, Henry (1965) (51) propuseram o modelo experimental de RC em dorso de rato com 10 cm de comprimento e 4 cm de largura.

Em pesquisa realizada por Kerrigan (1983) o autor observou necrose em 94,3% dos animais, com média de 25 a 50% da área necrótica e relatou que a necrose distal pode ser atribuída a fatores extrínsecos sistêmicos (infecção, arteriosclerose, desnutrição e hipotensão) ou locais (compressão, tensão, trombose e torção de pedículo) e que estes podem ser evitados com adequado preparo pré-operatório e no ato cirúrgico; e o único fator intrínseco identificado, e o mais importante de todos, é o inadequado fluxo sanguíneo (52).

Sendo assim torna-se importante a realização de pesquisas com o objetivo de aumentar o fluxo sanguíneo na região do retalho, pois dependendo da área em que é realizado o RC pode ocorrer necrose de 2 a 20% dos casos, muitas vezes levando o paciente a um período de tratamento prolongado e com maior custo (53).

Diante disso, tem se pesquisado estratégias de tratamento que favoreçam o aumento do fluxo sanguíneo na área do retalho. Dentre as alternativas que merece ser destacada e que possui eficácia comprovada é a TFBM a laser, a qual vem se destacando por ser um tratamento de

baixo custo, fácil manuseio e que atua favorecendo a vasodilatação e a formação de novos vasos (54–56).

1.5 Terapia por Fotobiomodulação em retalho cutâneo

A primeira pesquisa realizada com o intuito de investigar os efeitos da TFBM a laser na viabilidade do RC data de 1985 (57) e desde então muitos estudos foram realizados, como pode ser vistos na tabela 2. Na maioria dos estudos encontrados fica evidenciado a eficácia desta modalidade de tratamento, pois foi possível detectar que esse recurso terapêutico age aumentando o fluxo (57–59) e o número de vasos sanguíneo (54–56); diminuindo as concentrações dos malondialdeídos (60), modulando a atividade da matriz metaloproteinase 2, a expressão gênica VEGF e proteica HIF-1 α (37) e ciclooxigenase 2(61). Essas alterações celulares e moleculares culminam em um desfecho clínico desejável, o aumento da viabilidade do RC.

No estudo realizado por Kami et al. (1985), os autores realizaram a irradiação com os parâmetros descritos na tabela 2 em três grupos: grupo controle; grupo irradiado unicamente pré-operatório e grupo irradiado unicamente no pós-operatório. Na ocasião foi possível detectar que a TFBM a laser foi efetiva para proliferação de vasos, aumento do fluxo sanguíneo e aumento da viabilidade cutânea, não diferindo entre os grupos tratados (57).

No estudo realizado por Prado et al. (2010), visando encontrar o melhor comprimento de onda (670 ou 830 nm) da TFBM a laser para o aumento da viabilidade do RC, os autores estudaram 3 grupos, onde um deles não foi irradiado, outro recebeu a irradiação a laser 670 nm e o terceiro foi irradiado com laser 830 nm. Em ambos os grupos irradiados os autores utilizaram uma potência de 30 mW, por um tempo de 72 segundos, sendo entregue uma energia de 2,52 J em apenas um ponto central, localizado a 2,5 cm da base cranial do retalho por 5 dias consecutivos. Detectou-se que independentemente do comprimento de onda utilizado para a irradiação ocorreu aumento na viabilidade do RC, mas apenas no grupo irradiado com 670 nm foi observado uma diminuição na concentração dos malondialdeídos, um marcador de estresse oxidativo (60).

No estudo experimental realizado com o intuito de encontrar a potência mais efetiva para o aumento da viabilidade do RC, os autores (55) compararam os efeitos das potências de 30 e 60 mW, avaliando a área de sobrevivência do retalho e a densidade vascular em diferentes

regiões. Os pesquisadores concluíram que a TFBM a laser tem o efeito de aumentar a sobrevivência do RC e a densidade vascular, independentemente da potência utilizada.

Em um dos estudos mais recentes realizados com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na TFBM a laser na viabilidade do RC, Cury et al. (2013) compararam o grupo controle com grupos irradiados com laser 660 nm ou 780 nm com fluência de 30 ou 40 J/cm². Os autores concluíram que houve um aumento na angiogênese, na expressão do HIF-1 α e do VEGF e uma diminuição das metaloproteinase 2 e relataram ainda que esse fenômeno era dependente da fluência e do comprimento de onda utilizado (37).

Embora possa se observar que a TFBM a laser é eficiente para o aumento da viabilidade do tecido cutâneo, uma das dificuldades encontradas na prática clínica pelos profissionais da área da saúde para a utilização desse recurso é relatada por Hersant et al. (2015) em sua revisão de literatura, os autores concluem que a diversidade de parâmetros envolvidos na TFBM é um fator limitante para a utilização desse recurso (62). Nesta perspectiva já foram realizados estudos que compararam o melhor comprimento de onda (32,60,63); a melhor potência (55,61); a melhor fluência (32,64,65) e ainda melhor local de aplicação (45,66,67), mas apenas um estudo foi realizado investigando os mecanismos celulares dessa ação combinando os momentos de irradiação no pré e pós-operatório.

Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados em pesquisas com TFBM em RC.

Continua

Autor. Ano	Comprimento de onda (nm)	Fluência J/cm ²	Nº de pontos / dias de aplicações	Energia (J)	Potência (mW) / tempo de irradiação (s)	Resultado
Kami et al. 1985 (57)	830	15	18/ 5	0,3*	15/ 20*	Aumento da Viabilidade do RC nos grupos irradiados, proliferação de vasos e aumento do fluxo sanguíneo.
Smith et al. 1992(68)	632,8	--	--/ 10	0,0825	2,75/ 30	Não houve diferença estatística na viabilidade do RC entre os grupos irradiados.
Kubota et al.1996(58)	830	36	1 / 5	3,6	60/ 60*	Aumento da Viabilidade do RC nos grupos irradiados e da perfusão sanguínea no retalho.
Amir et al. 2000(69)	632,8	2,9	1 ou 2/ 5	1,8*	6/ 300 *	Aumento da Viabilidade do RC nos grupos irradiados.
Kubota et al. 2002(59)	830	185	1/ 5	1	100/ 10	Aumento viabilidade do RC e do fluxo sanguíneo nos grupos irradiados
Pinfildi et al. 2005(66)	632,8	3	27 ou 54 / 5	--	--/--	Aumento da viabilidade do RC nos grupos irradiados com melhor resultado no grupo 54 pontos.
Prado et al. 2006(70)	830	36	1/ 5	2,16	30/ 72	Aumento na viabilidade do RC no grupo irradiado.
Assis et al. 2006(63)	904 ou 670	16	1/5	--	15 ou 30/----	Aumento na viabilidade do RC no grupo irradiado, sendo melhor no grupo 670nm
Bossini et al. 2009 (54)	670	3; 6; 12 ou 24	24/ 5	0,18;0,36; 0,72 ou 1,44 *	30/ 6, 12, 24 ou 48 *	Aumento da viabilidade do RC e do número de vasos sanguíneos em todos os grupos irradiados, com melhor resultado com maior fluência
Cury et al. 2009 (32)	660 ou 780	30 ou 40	24/ 5	1,2 ou 1,6*	40/ 30 ou 40 *	A irradiação a laser não foi efetiva para aumentar a viabilidade do RC.

Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados em pesquisas com TFBM em RC.

						Continuação
Prado et al. 2009(67)	830	36	1, 2 ou 3/ 5	--	---/ 72 *	Aumento da viabilidade do RC nos grupos irradiados e o melhor resultado foi o grupo de 1 ponto a 2,5 da base do crânio.
Prado et al. 2010(60)	830 e 670	36	1/ 5	2,52	30/ 72 s	Aumento na viabilidade do RC nos grupos irradiados e redução dos malandialdeídos no grupo 670nm.
Costa et al. 2010 (55)	660	3	24/ 5	1,44	30 ou 60/ --	Aumento da viabilidade do RC e da densidade vascular nos grupos irradiados
Baldan et al 2010 (71)	670	2,14	12/ 3	0,06*	30/ 2*	Não houve diferença estatística entre os grupos.
Das Neves et al. 2011 (72)	830	36	-- / 5	2,52	30/ 84	Aumento da viabilidade do RC e no número de vaso sanguíneo no grupo irradiado
Esteves et al. 2011 (61)	660	10,36 ou 260,7	12/ 3	0,29 ou 7,30*	20 ou 100/ 14 ou 73*	Aumento da viabilidade do retalho e diminuição da cicloxigenase 2 ₂ no grupo irradiado com 100mW
Nishioka et al. 2012(73)	660	5 ou 89	1 /5	0,14 ou 2,49	60/ 2,3 ou 41,5s	Aumento da viabilidade do RC
Baldan et al. 2012 (65)	670	2,14; 5,36 ou 20,36	12/ 3	0,06; 0,15 ou 0,57*	30/ 2; 5 ou 19s	Aumento na viabilidade do retalho e grupo irradiado com 0,57J
Cury et al. 2013 (37)	660 e 780	30 ou 40	24/ 5	28,8 ou 38,4 [#]	40/ 30 ou 40s	Aumentou no número de vasos e na expressão de HIF-1 α e VEGF e diminuição da atividade de metaloproteinase 2
Baldan et al. 2015	670	100	12/ 3		2,79 J/ 30/ 93s*	Diminuição da viabilidade do RC na área irradiada.
Ma et al., 2018 (74)	810	11,3	3/ 4,7 10 e 14	59,66	100/360	Aumento da viabilidade do retalho e na revascularização
Martignago et al., 2018 (45)	660	40 ou 150	3 ou 12/ 5		1 ou 4 /50/ *	Aumento da viabilidade e na quantificação do colágeno no grupo irradiado em 3 pontos.

* Energia e tempo de irradiação por ponto irradiado # energia total.

Conclusão

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos dos tratamentos preemptivo associado ao tratamento pós-operatório com terapia por fotobiomodulação a laser (660 nm) com diferentes doses na viabilidade em retalhos cutâneos em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar qual o melhor local de aplicação da TFBM a laser para o aumento da viabilidade do RC;
- Avaliar os efeitos da aplicação do tratamento preemptivo com TFBM a laser em diferentes doses na viabilidade do RC;
- Estudar as possíveis alterações microscópicas provocadas pela aplicação preemptiva da TFBM a laser, com diferentes doses no número de vasos e de mastócitos;
- Analisar os efeitos da aplicação do tratamento preemptivo com TFBM a laser com diferentes doses na expressão de imunomarcadores; HIF-1 α ; FGF e VEGF.

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Martignago CCS, Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, et al. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2015 Jan 30 [cited 2019 Mar 1];30(1):203–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25171833>
2. Karu T. *Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy*. Gramgesberg, Sweden; 2007. 410 p.
3. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci*. 2018;17(8):1003–17.
4. Anders JJ. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy 1. 2015;33(4):183–4.
5. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *J Biophotonics* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Feb 27];9(11–12):1122–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201670113>
6. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2013 Mar [cited 2019 Feb 25];32(1):41–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049929>
7. Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *YSDER* [Internet]. 2008;27(4):227–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>
8. Freitas LF De, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. 2017;1–37.
9. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 Feb 25];23(4):355–61. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2005.23.355>
10. Karu TI, Pyatibrat L V, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2004 Feb [cited 2019 Mar 1];3(2):211–6. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b306126d>
11. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol*. 2018;94(2):199–212.
12. Hamblin MR. Invited Review Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. 2018;(1):199–212.
13. Karu TI. Invited Review Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. 2008;1988:1091–9.
14. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level lighththerapy. *Dose-Response*. 2009;7(4):358–83.

15. Hamblin MR, Huang YY, Sharma SK, Carroll J. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-Response*. 2011;9(4):602–18.
16. Rosso M, Buchaim D, Kawano N, Furlanette G, Pomini K, Buchaim R. Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. *Bioengineering* [Internet]. 2018 Jun 9 [cited 2019 Feb 27];5(2):44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29890728>
17. da Silva Oliveira VR, Cury DP, Yamashita LB, Esteca M V., Watanabe I-S, Bergmann YF, et al. Photobiomodulation induces antinociception, recovers structural aspects and regulates mitochondrial homeostasis in peripheral nerve of diabetic mice. *J Biophotonics* [Internet]. 2018 Sep [cited 2019 Feb 27];11(9):e201800110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749025>
18. Mesquita-ferrari NHCSRA, Rodrigues MFSD, Alves AN, Ribeiro BG, Silva EM, Fernandes KPS, et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. 2018;(June):4922–34.
19. Ramos L, Marcos RL, Torres-silva R. Characterization of Skeletal Muscle Strain Lesion Induced by Stretching in Rats : Effects of Laser Photobiomodulation. 2018;XX(Xx):1–8.
20. Kulkarni S, Meer M, George R, George R. Efficacy of photobiomodulation on accelerating bone healing after tooth extraction : a systematic review. 2018;
21. Van Houdt CIA, Tim CR, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl O, Ulrich DJO, et al. Bone regeneration and gene expression in bone defects under healthy and osteoporotic bone conditions using two commercially available bone graft substitutes. *Biomed Mater* [Internet]. 2015;10(3):35003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/10/3/035003>
22. Brassolatti P, Kido HW, Bossini PS, Gabbai-Armelin PR, Otterço AN, Almeida-Lopes L, et al. Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. *Biomed Mater Eng*. 2017;29(1):29–42.
23. Otterço AN, Andrade AL, Brassolatti P, Pinto KNZ, Araújo HSS, Parizotto NA. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2018;183:22–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.010>
24. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2008;14(1):105–18. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/teb.2007.0318>
25. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*. 2006;47(3):293–306.
26. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2009;122(18):3209–13. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.031187>

27. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601.
28. Ennis WJ, Lee C, Meneses P. A biochemical approach to wound healing through the use of modalities. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):63–72.
29. TAKEO, M., LEE, W., ITO M. Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1).
30. Fiorio FB, dos Santos SA, de Melo Rambo CS, Dalbosco CG, Serra AJ, de Melo BL, et al. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci*. 2017;32(8):1769–82.
31. das Neves LMS, Leite G de PMF, Marcolino AM, Pinfildi CE, Garcia SB, de Araújo JE, et al. Laser photobiomodulation (830 and 660 nm) in mast cells, VEGF, FGF, and CD34 of the musculocutaneous flap in rats submitted to nicotine. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2017;32(2):335–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2118-1>
32. Cury V. The Effects of 660 nm and 780 nm Laser Irradiation on Viability of Random Skin Flap in Rats. 2009;27(5):721–4.
33. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CADS. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):367–74.
34. Park IS, Chung PS, Ahn JC. Enhancement of ischemic wound healing by spheroid grafting of human adipose-derived stem cells treated with low-level light irradiation. *PLoS One*. 2015;10(6):1–16.
35. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2019 Feb 28];153(2):347–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027922>
36. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* [Internet]. 1997 Apr 17 [cited 2019 Mar 5];386(6626):671–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/386671a0>
37. Cury V, Moretti AI, Assis L, Bossini P, Crusca JS, Neto CB, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1alpha and MMP-2. *JPhotochemPhotobiolB*. 2013;125(1873–2682 (Electronic)):164–70.
38. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Mar 5];29(6):789–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164810>
39. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2019 Mar 5];13(1):9–22. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fasebj.13.1.9>

40. Aberto Balbino C, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão [Internet]. Vol. 41, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005 [cited 2019 Mar 5]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n1/v41n1a03.pdf>
41. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. BioEssays [Internet]. 2000 Jan 31 [cited 2019 Mar 5];22(2):108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655030>
42. Solmaz H, Dervisoglu S, Gulsoy M, Ulgen Y. Laser biostimulation of wound healing: bioimpedance measurements support histology. Lasers Med Sci [Internet]. 2016;31(8):1547–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2013-9>
43. Soleimani H, Amini A, Taheri S, Sajadi E, Shafikhani S, Schuger LA, et al. The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats. J Photochem Photobiol B Biol. 2018;181(November 2017):23–30.
44. Pinfildi CE, Hochman BS, Nishioka MA, Sheliga TR, Neves MAI, Liebano RE, et al. What is better in TRAM flap survival: LLLT single or multi-irradiation? Lasers Med Sci. 2013;28(3):755–61.
45. Martignago CCS, Tim CR, Assis L, Neves LMG, Bossini PS, Renno AC, et al. Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats. Lasers Med Sci [Internet]. 2018 Dec 19 [cited 2019 Feb 25]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-018-2694-3>
46. Franco T. Princípios da Cirurgia Prática. 2002. 968 p.
47. FERREIRA LM. Manual de cirurgia plástica. São Paulo; 1995. 45-62 p.
48. Huang N, Khan A, Ashrafpour H, Neligan PC, Forrest CR, Kontos CD, et al. Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. 2006;8.
49. Mélega, José Marcos; Viterbo, Fausto; Mendes FH. Cirurgia Plástica - Os Princípios e a Atualidade. 2011. 1332 p.
50. Lucas JB. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. Facial Plast Surg Clin NA [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.003>
51. MCFARLANE RM, DEYOUNG G, HENRY RA. the Design of a Pedicle Flap in the Rat To Study Necrosis and Its Prevention. [Internet]. Vol. 35, Plastic and reconstructive surgery. 1965. p. 177–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14264468>
52. KERRIGAN C. Skin flap failure: pathophysiology. Plast Reconstr Surg. 1983;72(6):766–77.
53. Frederick JW, Sweeny L, Carroll WR, Peters GE, Rosenthal EL. Outcomes in head and neck reconstruction by surgical site and donor site. Laryngoscope. 2013;123(7):1612–7.

54. Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. 2009;209–13.
55. Costa MS, Pinfildi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, et al. Effect of low-level laser therapy with output power of 30 mW and 60 mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):57–61.
56. Cury V, Moretti AIS, Assis L, Bossini P, De Souza Crusca J, Neto CB, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2013;125:164–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004>
57. Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Ohshiro T, Fujino T. Effects of low-power diode lasers on flap survival. *Ann Plast Surg* [Internet]. 1985 Mar [cited 2019 Feb 26];14(3):278–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3994272>
58. Kubota J, Ohshiro T. ORIGINAL ARTICLES THE EFFECTS OF DIODE LASER LLLT ON FLAP SURVIVAL : MEASUREMENT OF FLAP MICROCIRCULATION WITH LASER. 1996;241–6.
59. Kubota J. Effects of Diode Laser Therapy on Blood Flow in. 2002;(1):146–53.
60. Prado R, Neves L, Marcolino A, Ribeiro T, Pinfildi C, Ferreira L, et al. Effect of low-level laser therapy on malondialdehyde concentration in random cutaneous flap viability. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2010 Jun [cited 2019 Feb 27];28(3):379–84. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/pho.2009.2535>
61. Esteves I, Masson IB, Oshima CTF, Paiotti APR, Liebano RE, Plapler H. Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):655–60.
62. Hersant B, SidAhmed-Mezi M, Bosc R, Meningaud JP. Current indications of low-level laser therapy in plastic surgery: a review. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2015;33(5):283–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954831>
63. Assis LR, Marcolino AM, Pinfildi CE, Prado RP, Lourencin F, Ferreira LM. Comparação dos laser diodo 904 e 670 nm na viabilidade do retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. *Fisioter Bras*. 2006;7(1):36–9.
64. Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, et al. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(2):209–13.
65. Baldan CS, Pasqual A, Marques, Maria A, Schiavinato, Aparecida, Raquel C. The effects of different doses of 670 nm diode laser on skin flap survival in rats. *Acta Cirúrgica Bras*. 2012;27(2):155–61.
66. Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium – Neon Laser in Viability of Random Skin Flap in Rats. 2005;77(April):74–7.

67. Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Effect of Application Site of Low-Level Laser Therapy in Random Cutaneous Flap Viability in Rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2009;27(3):411–6. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2008.2320>
68. Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1992 Feb [cited 2019 Feb 26];89(2):306–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732900>
69. Amir A, Solomon AS, Giler S, Hauben M, J. C, Hauben D. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* , 53, 58-62. 2000;53:5862.
70. Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats 1 Modelo experimental para laserterapia de baixa intensidade em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. 2006;1–5.
71. Baldan C, Pasqual AM, Schiavinato AM, Casarotto RA, Fisioterapia C De, Paulo-sp S, et al. Dose-dependência do laser de baixa intensidade (670 nm) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos Dose-dependency of LLLT on the viability of random skin flaps in rats. 2010;28(4):2008–11.
72. das Neves LMS, Marcolino AM, Prado RP, De Souza Ribeiro T, Pinfildi CE, Thomazini JA. Low-Level Laser Therapy on the Viability of Skin Flap in Rats Subjected to Deleterious Effect of Nicotine. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2011;X(X):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21456941>
73. Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: Angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci*. 2012;27(5):1045–50.
74. Ma J-X, Yang Q-M, Xia Y-C, Zhang W-G, Nie F-F. Effect of 810 nm Near-Infrared Laser on Revascularization of Ischemic Flaps in Rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2018 Jun [cited 2019 Feb 26];36(6):290–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29882737>

**Comparação de dois diferentes protocolos de aplicação da
fotobiomodulação a laser na viabilidade do retalho cutâneo randômicos em
ratos**

*Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the
viability of random skin flap in rats.*

Observação: Artigo publicado na revista “*Lasers in Medical Science*” (anexo I) sob autoria de: Cintia Cristina Santi Martignago; Carla Roberta Tim; Livia Assis; Lia Mara Grosso Neves; Paulo Sérgio Bossini; Ana Cláudia Renno; Lucimar Avô; Richard Elons Liebano e Nivaldo Antonio Parizotto.

RESUMO

Objetivo: identificar o melhor local de aplicação da fotobiomodulação (FBM) a laser com o mesmo tempo de irradiação para o aumento da viabilidade do retalho cutâneo.

Metodologia: 18 ratos machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia Mammalia*), foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n= 6). O grupo I (GI): foi submetido à simulação da FBM a laser, o grupo II (GII): foi submetido à FBM a laser em três pontos na base cranial do retalho e o grupo III (GIII): foi submetido a FBM a laser em doze pontos distribuídos no interior do retalho. Todos os grupos foram irradiados com um laser de diodo de Arseneto de Gálio, Índio, Alumínio e Fósforo (InGaAsAlP), 660 nm com potência de 50 mW, irradiados por 240 segundos no modo de emissão contínuo. O tratamento iniciou imediatamente após a realização do retalho cutâneo randômico de base cranial (dimensão de 10X4 cm²) sendo reaplicado a cada 24 horas até completar 5 aplicações. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia pós-operatório após a avaliação da porcentagem da área necrótica e a coleta do material para análise histológica.

Resultados: os animais do GII apresentaram uma diminuição significativa da área da necrose quando comparado com os demais grupos, e um aumento significativo na quantificação do colágeno quando comparado com o grupo controle, não foi possível observar diferença estatística entre os imunomarcadores TGF β e FGF nos diferentes grupos avaliados. **Conclusão:** a aplicação da FBM a laser em três pontos na base cranial do retalho foi mais eficiente quando comparada a de doze pontos para a diminuição da área da necrose.

Palavras Chave: Retalho cutâneo, Viabilidade do tecido, fotobiomodulação a laser, colágeno, Fator de Crescimento Transformador Beta e Fator de Crescimento de Fibroblastos

4.1 INTRODUÇÃO

O retalho cutâneo é uma técnica amplamente utilizada em cirurgias plásticas para reconstruir defeitos na pele e em tecidos moles [1]. No entanto, o mesmo apresenta algumas complicações, dentre elas a isquemia tecidual [2] que pode variar de 2 a 20% dos casos, dependendo da área em que o retalho é realizado [3]. Essa complicação é uma grande preocupação para os profissionais da área da saúde, pois pode requerer intervenções cirúrgicas secundárias, ocasionar infecções e retardar o tratamento.

Considerando a complexidade dessas complicações e as alterações que elas podem causar na qualidade de vida dos pacientes, têm sido cada vez mais investigando tratamentos que favorecem a vascularização tecidual. Nesta perspectiva, o uso da Fotobiomodulação (FBM) laser tem sido investigado [4-7], visto que este recurso tem mostrado resultados em várias fases, acelerando o processo de reparo de feridas, incluindo o aumento da diferenciação e proliferação celular, a neovascularização, a estimulação da síntese de colágeno e a reepitelização [8].

Acredita-se que o aumento no número de vasos sanguíneos e a liberação de óxido nítrico sejam responsáveis pela redução do tecido necrótico [9-11]. Além disso, sabe-se que tecidos com maior concentração de colágeno possuem maior resistência à tração; característica essa importante para a qualidade do tecido [12].

O Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) e o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) são membros de famílias de proteínas intimamente ligadas à neoformação vascular e à modulação da síntese de colágeno [13]. O TGF β participa como um modulador da matriz extracelular que auxilia na síntese do colágeno e regula a expressão de vários genes que codificam as metaloproteinases [14]. Estudos demonstraram que ambas as proteínas mencionadas anteriormente podem sofrer efeitos de modulação quando estimuladas com FBM, interferindo assim no processo de remodelação da pele [15-17].

Na revisão de literatura realizada por Hersant. et al. [18] sobre o uso de FBM em cirurgia plástica, os autores relatam que a variedade de parâmetros e sua influência nas respostas celulares prejudicam a compreensão dos efeitos da, portanto, têm sido realizados estudos com o objetivo de encontrar os melhores parâmetros para o aumento da viabilidade do retalho cutâneo. Nessa perspectiva, alguns estudos comparam o melhor comprimento de onda [6, 19], potência [9, 20], fluência [5, 10] e o local de aplicação [21-23].

Com relação ao local de aplicação da FBM, pesquisas [23, 24] padronizaram a fluência nos diferentes pontos. No trabalho atual, utilizou-se um tempo de irradiação fixo fornecido aos tecidos nos diferentes protocolos. A hipótese do presente estudo é que o existiria diferença quando utilizado diferentes números de pontos de aplicação de FBM a laser sobre o retalho. Sendo assim o objetivo do presente estudo foi identificar se existe diferença entre o número de pontos em que o FBM a laser é aplicado no tecido quando utilizado o mesmo tempo de irradiação total para o aumento da viabilidade do retalho cutâneo.

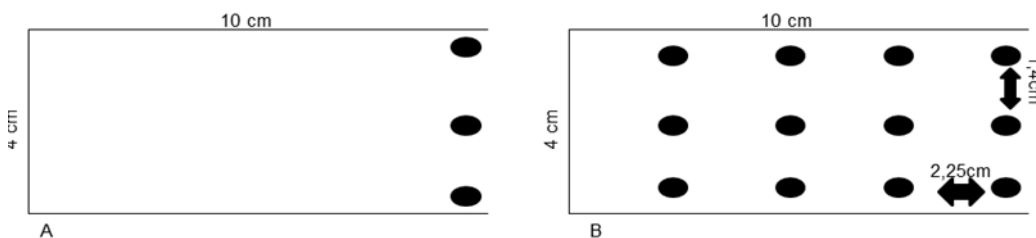
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Delineamento experimental

Para a realização deste estudo foram utilizados 18 ratos machos (*Ratos norvegicus: var. albinus, Rodentia Mammalia*), com aproximadamente 3 meses de idade e massa corpórea de $296,39 \pm 26,86$ g. Esses animais foram divididos aleatoriamente, previamente a realização do retalho cutâneo, por sorteio em 3 grupos com 6 animais em cada grupo:

- GI: grupo controle, submetido à simulação da FBM a laser com o aparelho desligado;
- GII: animais que receberam a FBM a laser em três pontos (FIGURA 1 - A);
- GIII: animais que receberam a FBM a laser em doze pontos (FIGURA 1 - B).

Figura 1- Imagem representativa do molde plástico utilizado para a padronização dos pontos de irradiação com a FBM a laser nos diferentes grupos.



A- molde utilizado nos animais do GII. B- molde utilizado nos animais do GIII

Esse estudo foi inicialmente aprovado pela comissão de ética no uso de animais pelo número 6224290515 e conduzido de acordo com as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

4.2.2. Procedimento operatório

Os animais foram anestesiados proporcionalmente à massa corpórea, via intraperitoneal, com a associação de quetamina (95mg/Kg) e xilazina (12 mg/kg - Syntec®). Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com a extensão dos quatro membros e tiveram seus dorsos tricotomizados digitalmente. O retalho cutâneo randômico de base cranial de 10 cm de comprimento e 4 cm de largura [25], foi então marcado no dorso dos animais. Os retalhos foram então elevados do dorso dos animais incluindo a fáscia profunda e superficial dos músculos, panículo carnoso e pele. Uma barreira plástica, com as mesmas dimensões do retalho, foi interposta entre o retalho e o local doador. O retalho foi então devolvido à sua posição original e suturado com pontos simples de náilon 4/0.

4.2.3 Protocolo da fotobiomodulação à laser

Os animais foram irradiados com um laser de Arseneto de Gálio, Índio, Alumínio e Fósforo (InGaAlPAs), 660 nm (Photon Laser III, DMC®, São Carlos, SP, Brasil) com área de feixe de 0,028 cm², potência de 50 mW no modo de emissão contínuo.

Tabela 1 - Parâmetros de tratamento com FBM a laser

Parâmetros [uni]	GII	GIII
Área do feixe [cm ²]	0,028	0,028
Irradiância [W/cm ²]	1,78	1,78
Duração da exposição [seg]	240	240
Fluência [J/cm ²]	150	40
Energia [J]	4	1
Número de pontos irradiados	3	12
Área irradiada [cm ²]	0,084	3,36
Técnica de aplicação	Contato com a pele	Contato com a pele
Número e frequência de tratamento	5 dias consecutivos	5 dias consecutivos
Energia Total [J]	12	12

Os animais do GII foram irradiados com uma fluência de 150 J/cm², por 80 segundos em cada ponto, sendo entregue 4 J de energia por ponto, enquanto os animais

do GIII receberam a irradiação com uma fluência de 40 J/cm² por 20 segundos em cada ponto, sendo entregue uma energia por ponto de 1J, o tempo total de irradiação em ambos os grupos, foi de 240 segundos. O tratamento teve início imediatamente após o procedimento operatório sendo reaplicado a cada de 24 horas até o 4º dia pós-operatório, totalizando assim 5 aplicações (tabela-1).

4.2.4 Análises

4.2.5 Método de determinação da porcentagem da área de necrose dos retalhos

A determinação da porcentagem da necrose foi realizada no 7º dia pós-operatório, por meio do método do gabarito de papel [26]. Foi traçado o molde de todos os retalhos cutâneos em papel vegetal e delimitada a área necrosada (pele escurecida, fria e sem pelos) da área viável (pele macia, rósea, quente e com pelos), esse molde foi então recortado e teve seu peso aferido em uma balança de precisão (erro de +/-0,0001g). A área de necrose foi separada da área viável do molde e também foi aferida. A porcentagem da área de necrose foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ da área de necrose} = \frac{\textit{peso do molde de papel da área total}}{\textit{peso do molde do papel da área necrosada}} \times 100$$

4.2.6 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico com quetamina (285mg/k) e xilazina (36mg/k) no 7º dia pós-operatório após a coleta dos tecidos.

4.2.7 Coleta da amostra da pele e preparação para a análise histológica.

As amostras da pele foram coletadas logo acima do ponto mais alto de separação entre o tecido viável e o tecido necrótico com 1 cm² [6].

Após a coleta, as peças permaneceram em soluções de formaldeídos a 10% por 24 horas para fixação. Em seguida, elas foram lavadas em água por 24 horas. Na sequência, passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100%, sendo 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 em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e em

seguida foram realizados mais 2 banhos de xilol puro, com duração de 1 hora cada banho. Para finalizar, as peças foram incluídas em parafina e cortadas em um micrótomo rotativo, Spencer – 820 com espessura de 5 μm .

4.2.8 Análise Histológica descritiva

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analisadas quanto às características microscópicas por uma patologista no Microscópio Óptico (OLYMPUS BX53) com um aumento de 200x, sendo avaliado a integridade das camadas da pele, a formação de tecido inflamatório e a presença de infiltrado inflamatório.

4.2.9 Quantificação das fibras de colágenos

As lâminas coradas com Picosírus Red foram analisadas com a finalidade de quantificar o colágeno tipo I e III, sem diferenciá-los. As imagens foram capturadas em um Microscópio Óptico (OLYMPUS BX53) com aumento de 400x. Essas imagens foram analisadas com a ajuda do software *ImageJ*, como o proposto por Manni et al. [27]. Cada lâmina foi analisada em cinco campos distintos e a média da quantificação foi usada para análise estatística.

4.2.10 Análise de Imunoistoquímica

Para a análise de imunoistoquímica inicialmente foi realizada a desparafinização e re-hidratação do material em etanol graduado e em seguida os cortes foram tratados em um Steamer (potência de 850 W) com tampão 0,01 M de ácido cítrico (pH 6), por 5 minutos para a recuperação antigênica.

O material foi então pré-incubado em solução salina tamponada de fosfato com peróxido de hidrogênio a 30% durante 5 min para inativação da peroxidase endógena, logo após, as amostras foram então incubadas com anticorpos primários do TGF- β (sc398, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA na titulação de 1:1000) e FGF (sc1884, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA na titulação de 1:500) por 2 horas, logo em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e foi aplicado o anticorpo secundário marcado com biotina (kit ABC, PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)

a diluição 1:5 durante 30 min. Logo em seguida, foi realizado a detecção colorimétrica com um substrato diaminobenzidina (DAB, SK-4100, laboratórios Vector, Burlingame, CA, EUA) por 3 minutos e por fim o material foi corado com hematoxilina e realizado a montagem das lâminas.

Os resultados foram avaliados tanto qualitativamente (presença dos imunomarcadores) como semi-quantitativamente (percentagem de células marcadas). As lâminas foram pontuadas em um score de 1 a 4 (1= ausente, 2= fraco, 3= moderada e 4= intensa) para a análise imunoistoquímica [28]. A avaliação foi realizada por dois observadores experientes de forma cega.

4.2.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de técnicas descritivas, em gráficos, na forma de média, desvio padrão. A normalidade dos dados foi testada com Shapiro Wilk e a homogeneidade com o teste de Levene. Para a comparação entre os grupos foi realizada a análise de variância ANOVA- *One way* nos casos em que os dados eram normais e homogêneos (área da necrose e quantificação das fibras do colágeno), nos casos de presença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi realizado o *pós-hoc* de Tukey. E em casos de dados não normais ou não homogêneos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (expressão do TGF- β e FGF), na presença de diferença significativa ($p < 0,05$) foi aplicado o teste de *post-hoc* de Mann-Whitney.

O tamanho da amostra foi calculado considerando uma diferença de 26,2% na área da necrose (desfecho primário) entre os grupos e um desvio-padrão estimado de $\pm 8,32\%$ [20]. Para um nível de significância de 0,05 e poder de 80%, foi calculado que seriam necessários 4 animais em cada grupo (Minitab, v.17, StateCollege, PA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Área da Necrose

A figura 2A ilustra os resultados da análise referente à área da necrose. Foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os animais do GII (38,91% $\pm 10,75$) ($p=0,004$) quando comparado com o GI (63,84% $\pm 9,33$) e com o GIII (57,82% $\pm 13,21$) ($p=0,027$). Desta forma, os animais GII apresentaram melhor resultado.

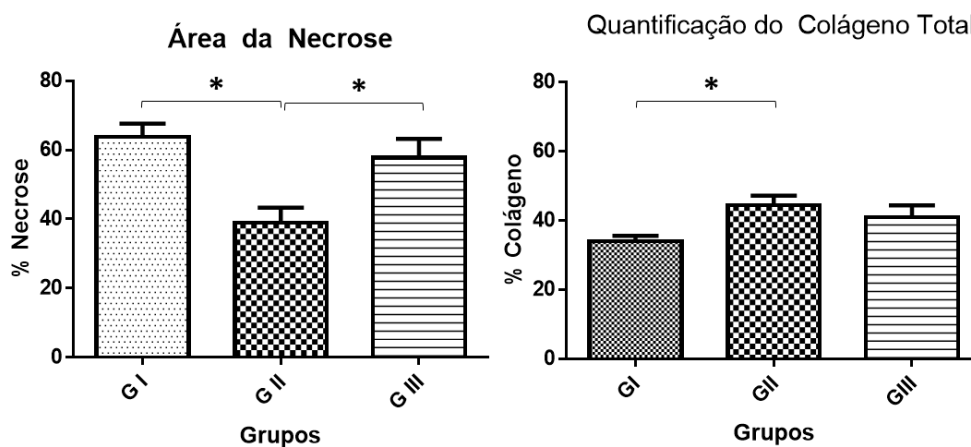
4.3.2 Descrição Morfológica

A avaliação qualitativa das camadas do tegumento demonstrou que elas estavam bem organizadas e com morfologia preservada em todos grupos. Observamos também a formação de tecido de granulação e infiltrado inflamatório predominantemente na hipoderme em direção ao pânículo carnosos na maior parte da lâmina analisada, independente do grupo.

4.3.2 Quantificação das Fibras de Colágeno

A figura 2B ilustra a comparação entre os grupos dos valores obtidos para quantificação do colágeno. Foi detectada diferença estatística entre os grupos avaliados ($p=0,049$), essa diferença se deu entre o GI ($33,98\pm 3,93$) e o GII ($44,39\pm 6,81$) ($p=0,043$) e nenhuma outra diferença estatística foi encontrada nesta variável.

Figura 2 - Representação gráfica dos resultados referente as variáveis % de área de necrose e colágeno total nos diferentes grupos irradiados.



A- Representação gráfica dos resultados da % da área de necrose 2B- Representação Gráfica da % de colágeno; G I- Controle; G II- animais Irradiado em 3 pontos; G III- animais irradiados em 12 pontos. *presença de diferença estatisticamente significante

4.3.3 Expressão de TGF- β

A avaliação da imunistoquímica demonstrou que a expressão de TGF- β foi observada principalmente no núcleo dos fibroblastos para todos os grupos (Fig. 3A). Não houve diferença entre os grupos experimentais em análises semi-quantitativas (Fig. 3C).

4.3.4 Expressão FGF

Na análise qualitativa, foi detectada a expressão de FGF no núcleo de fibroblastos em todos os grupos (Fig. 3D). No entanto, não foi observada diferença entre os grupos experimentais em análises semi-quantitativas (Fig. 3B).

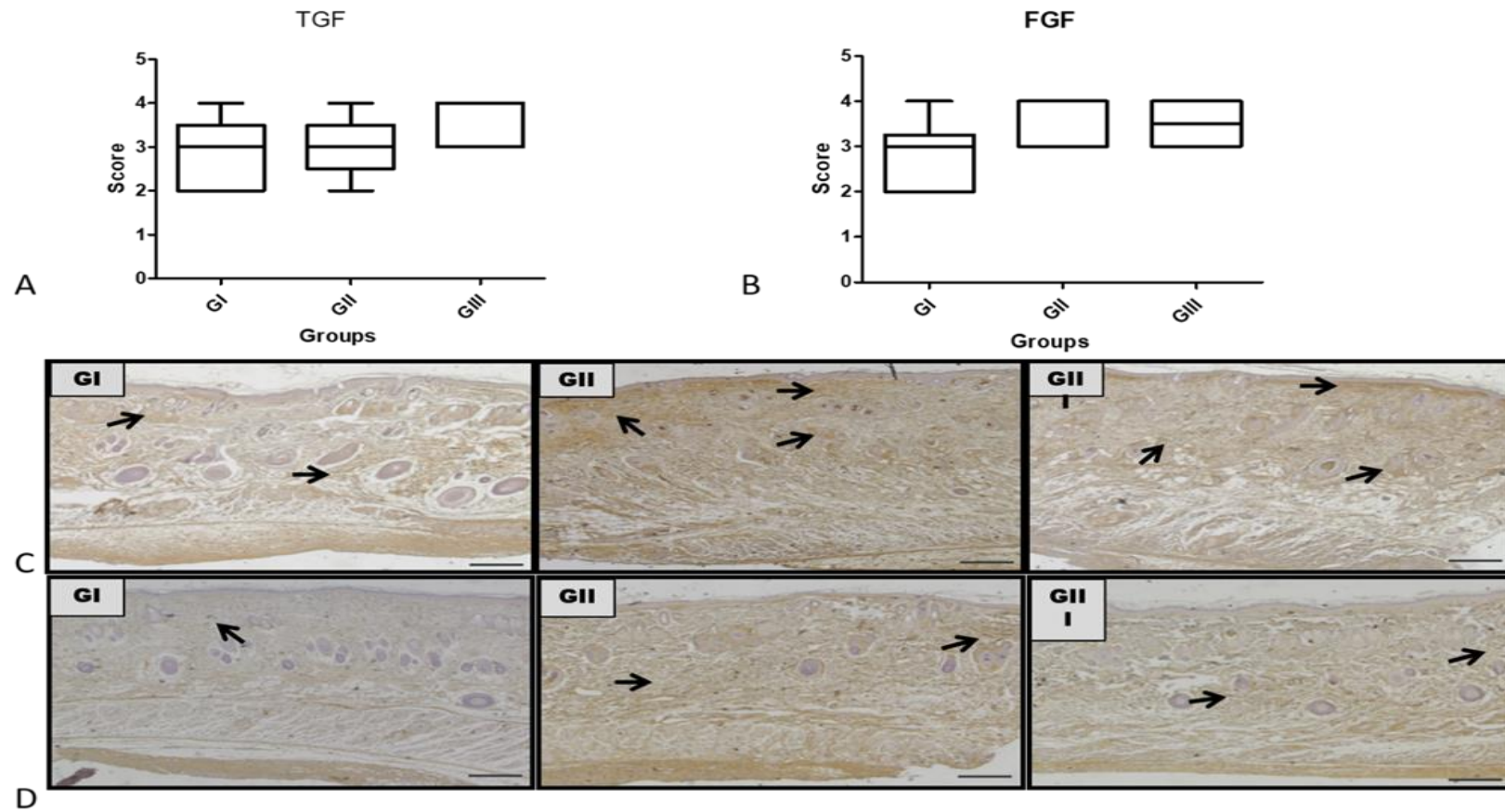
4.4 Discussão

Alguns estudos já foram realizados objetivando encontrar o melhor local de aplicação da FBM a laser para o aumento da viabilidade do tecido cutânea [21-24]. Desses alguns padronizaram a fluência, enquanto outros diferenciaram os números dos pontos e ainda outros o local da aplicação, tornando o tempo de irradiação dos tecidos diferente. Em nossa pesquisa, padronizamos o tempo de irradiação do tecido e diferenciamos o local de irradiação da FBM a laser.

No estudo de Pinfildi et al. [23], os autores propuseram três diferentes locais de irradiação, dois com o mesmo número de pontos, em diferentes locais de aplicação e outro com maior número de pontos, sendo a mesma fluência em pontos. Observou-se que o grupo que recebeu o maior número de pontos de aplicação obteve um resultado melhor. Nesse contexto, é importante considerar que o efeito da FBM é dose dependente [5, 29, 30]. Assim, o resultado encontrado por Pinfildi et. al. [23] pode ter sido tanto pelo local da irradiação como pela diferente energia total entregue ao tecido.

Embora muito tenha sido estudado sobre o FBM a laser, ainda não há consenso entre os pesquisadores sobre qual seria a melhor métrica para descrever a dose de tratamento utilizada [30]. Alguns autores [31, 32] sugerem que estudos experimentais e clínicos detalhem os parâmetros mais relevantes utilizados, permitindo a reprodutibilidade do experimento. Pesquisas mais antigas costumavam descrever a dose levando em conta a fluência utilizada para a irradiação, mas considerando que esse parâmetro é inversamente proporcional ao diâmetro do feixe [31, 32], qualquer alteração na área do feixe do equipamento dificultaria a reprodutibilidade do protocolo. Outra opção, é a padronização dos valores do tempo de exposição à irradiação [29], que é diretamente proporcional à energia, um parâmetro também amplamente utilizado que influencia os resultados do tratamento [32].

Figura 3 - Demonstração gráfica dos escore Imunoistoquímico e fotomicrografia representativa dos marcadores avaliados nos diferentes grupos.



A- Gráfico da análise semiquantitativa da imunoistoquímica do TGF- β ; B- Gráfico da análise semiquantitativa da imunoistoquímica do FGF; C- Imagem representativas da imunoistoquímica do tecido cutâneo dos diferentes grupos avaliados para o fator TGF- β . D- Imagem representativas da imunoistoquímica do tecido cutâneo dos diferentes grupos avaliados de FGF. Fibroblastos imunomarcados em marrom (seta). GI ;Grupo Controle; GII: Grupo irradiado em 3 pontos e GIII grupo irradiado em 12 pontos (Barra de escala: 50 μ m).

Os resultados encontrados em nossa pesquisa corroboram com o encontrado por Prado et al. [24], os autores compararam o efeito da aplicação da FBM a laser em diferentes números de pontos e a mesma fluência foi padronizada em todos os pontos, fazendo com que o tecido fosse exposto a diferentes tempos de irradiação. O grupo que foi irradiado por um tempo menor e mais próximo da base do crânio apresentou o melhor resultado, demonstrando que o local onde a energia é depositada no tecido é importante, e quanto mais próxima da base cranial melhor.

Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Kubota [22], em que o autor não obteve diferença estatística entre animais irradiados em diferentes pontos, utilizando o mesmo tempo de irradiação. Esta discordância nos resultados pode ter sido devido à distribuição do tempo de irradiação nos pontos, inferindo assim que a maneira na qual o tempo de irradiação é distribuído no tecido está relacionada com a eficácia do tratamento.

Com relação aos resultados da quantificação de fibras colágenas do presente estudo, observou-se que o grupo irradiado em 3 pontos, foi mais eficiente no aumento da síntese de colágeno quando comparado ao grupo controle. Diversos estudos foram realizados buscando elucidar o desempenho da FBM laser na síntese de colágeno [33-35] e tem demonstrado seu efeito no aumento da síntese de colágeno.

Sabe-se que o FGF é liberado por células inflamatórias durante o reparo tecidual e desempenha um papel importante na estimulação e proliferação de fibroblastos para formar novos componentes extracelulares e de colágeno, favorecendo assim a contração da ferida. O presente estudo não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais, estando de acordo com os resultados da pesquisa de Neves et al. [16], onde a comparação dos lasers de 660 e 830 nm levou ao aumento da viabilidade do retalho do músculo abdominal em animais induzidos ou não por nicotina e não apresentaram diferença significativa na marcação de FGF entre animais normais.

O número de animais utilizados nesse estudo pode ter sido uma limitação nos imunomarcadores estudados. O cálculo amostral foi realizado com base em nosso desfecho primário (viabilidade do retalho cutâneo), e acreditamos que estudos com maior número de animais facilitariam a compreensão dos resultados histológicos e imunoistoquímicos.

4.5 Conclusão

O presente trabalho conclui que a irradiação em três pontos da base do retalho craniano foi mais efetiva que em 12 pontos para redução da área de necrose, bem como no aumento da síntese de colágeno quando comparado ao grupo controle.

4.6 Agradecimentos

Agradecemos as contribuições da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (projeto 2015/13501-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ (309308 / 2017-8) pelo apoio financeiro da presente pesquisa.

4.7 Referência Bibliográfica

1. Krammer CW, Ibrahim RM, Hansen TG, Sørensen JA (2015) The effects of epinephrine and dobutamine on skin flap viability in rats: A randomized double-blind placebo-controlled study. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 68:113–119. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.09.044>
2. KERRIGAN C. (1983) Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 72:766–777
3. Frederick JW, Sweeny L, Carroll WR, et al (2013) Outcomes in head and neck reconstruction by surgical site and donor site. *Laryngoscope* 123:1612–1617. <https://doi.org/10.1002/lary.23775>
4. Cristiano S Baldan; Igor FB Masson; Ivaldo Esteve Júnior; Alessandra Maria S Baldan; Aline F P Machado; Raquel Casaroto; Richard E Liebano (2015) Inhibitor effects of low-level laser therapy on skin-flap survival in a rat model. *Past Surg* 23:35–39
5. Baldan CS, Pasqual A, Marques, et al (2012) The effects of different doses of 670 nm diode laser on skin flap survival in rats. *Acta Cirúrgica Bras* 27:155–161. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000200010>
6. Cury V, Moretti AI, Assis L, et al (2013) Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *JPhotochemPhotobiolB* 125:164–170
7. Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, et al (2012) LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: Angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci* 27:1045–1050. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-1042-7>

8. Gupta A, Dai T, Hamblin MR (2014) Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. 257–265. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1319-0>
9. Costa MS, Pinfield CE, Gomes HC, et al (2010) Effect of low-level laser therapy with output power of 30 mW and 60 mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg* 28:57–61. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2444>
10. Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, et al (2009) Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci* 24:209–213. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0551-5>
11. Gribbe O, Samuelson UE, Wiklund NP (2007) Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 60:287–93. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2006.07.004>
12. Balasubramanian P, Prabhakaran MP, Sireesha M, Ramakrishna S (2012) Collagen in Human Tissues: Structure, Function, and Biomedical Implications from a Tissue Engineering Perspective. *Adv Polym Sci* 251:173–206
13. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>
14. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE (2000) Transforming growth factor β inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1490:259–268. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00002-6)
15. Houreld NN, Ayuk SM, Abrahamse H (2014) Expression of genes in normal fibroblast cells (WS1) in response to irradiation at 660 nm. *J Photochem Photobiol B Biol* 130:146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.11.018>
16. das Neves LMS, Leite G de PMF, Marcolino AM, et al (2017) Laser photobiomodulation (830 and 660 nm) in mast cells, VEGF, FGF, and CD34 of the musculocutaneous flap in rats submitted to nicotine. *Lasers Med Sci* 32:335–341. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2118-1>
17. Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC (2015) Prevention of skin flap necrosis by use of adipose-derived stromal cells with light-emitting diode phototherapy. *Cytotherapy* 17:283–292. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.10.017>
18. Hersant B, SidAhmed-Mezi M, Bosc R, Meningaud JP (2015) Current indications of low-level laser therapy in plastic surgery: a review. *Photomed Laser Surg* 33:283–97. <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3822>
19. Prado RP, Garcia SB, Thomazini J a, Piccinato CE (2012) Effects of 830 and 670 nm Laser on Viability of Random Skin Flap in Rats. *Photomed Laser Surg* 30:418–424. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3042>
20. Esteves I, Masson IB, Oshima CTF, et al (2012) Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats.

- Lasers Med Sci 27:655–660. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-1011-1>
21. Amir A, Solomon AS, Giler S, et al (2000) The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* , 53, 58-62 53:5862
 22. Kubota J (2002) Effects of Diode Laser Therapy on Blood Flow. *Lasers Med Sci*, 17:146–153
 23. Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM (2005) Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med* 37:74–77. <https://doi.org/10.1002/lsm.20190>
 24. Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, et al (2009) Effect of Application Site of Low-Level Laser Therapy in Random Cutaneous Flap Viability in Rats. *Photomed Laser Surg* 27:411–416. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2320>
 25. MCFARLANE RM, DEYOUNG G, HENRY RA (1965) the Design of a Pedicle Flap in the Rat To Study Necrosis and Its Prevention. *Plast. Reconstr. Surg.* 35:177–82
 26. Sasaki GH, Pang CY (1980) Hemodinamics and Viability of Acute Neurovascular Island Skin Flaps in Rats. *Plast Reconstr Surg* 65:152–158
 27. Manni ML, Czajka CA, Oury TD, Gilbert TW (2011) Extracellular Matrix Powder Protects Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Tissue Eng Part A* 17:2795–2804. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0023>
 28. Kashimura T, Soejima K, Asami T, et al (2015) The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. *J Investig Surg* 1939:1–7. <https://doi.org/10.3109/08941939.2015.1035820>
 29. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR (2009) Biphasic dose response in low level lighththerapy. *Dose-Response* 7:358–383. <https://doi.org/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>
 30. Hamblin MR, Huang YY, Sharma SK, Carroll J (2011) Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-Response* 9:602–618. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
 31. Jenkins PA, Carroll JD (2011) How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. *Photomed Laser Surg* 29:785–787. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.9895>
 32. Enwemeka CS (2009) Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg* 27:387–393. <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2503>
 33. Otterço AN, Andrade AL, Brassolatti P, et al (2018) Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. *J Photochem Photobiol B Biol* 183:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.010>

34. Figurová M, Ledecký V, Karasová M, et al (2016) Histological Assessment of a Combined Low-Level Laser/Light-Emitting Diode Therapy (685 nm/470 nm) for Sutured Skin Incisions in a Porcine Model: A Short Report. *Photomed Laser Surg* 34:53–5. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4013>
35. Gonçalves RV, Sarandy MM, da Matta SLP, et al (2013) Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of *Brassica oleracea* on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. *Pathol Res Pract* 209:648–653. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.07.006>

Tratamento preemptivo com terapia por fotobiomodulação na viabilidade do retalho cutâneo.

Preemptive treatment with therapy photobiomodulation on the viability of the skin flap.

Observação: Artigo submetido “*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*” (anexo III) sob autoria de: Cintia Cristina Santi Martignago; Carla Roberta Tim; Lívia Assis; Ana Laura Andrade Martins; Patrícia Brassolati, Paulo Sérgio Bossini; Richard Eloin Liebano e Nivaldo Antonio Parizotto. .

RESUMO

O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico muito utilizado na cirurgia plástica reparadora, entretanto pode ocorrer complicações como isquemia seguida de necrose local, havendo a necessidade de novo procedimento cirúrgico. Sabe-se que a terapia por fotobiomodulação (TFBM) é uma técnica eficaz na melhora da microcirculação e da neoangiogênese, o que contribui positivamente no suprimento sanguíneo no período pré e pós cirúrgico. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento preemptivo com TFBM a laser com diferentes energias na viabilidade em retalhos cutâneos em ratos. Sessenta e três ratos, Wistar, machos, aleatorizados em cinco grupos: Grupo Controle (GC) (n= 15): simulação da TFBM,; Grupo preemptivo laser 1,1J (GP1) (n= 15): TFBM a laser preemptivo com 1,1J de energia por ponto; Grupo preemptivo laser 4J (GP4) (n= 15): TFBM preemptivo com 4J de energia por ponto; Grupo laser 1,1J (G1) (n= 9): TFBM imediatamente após a cirurgia com 1,1J de energia por ponto; Grupo laser 4J (G4) (n= 9): TFBM imediatamente após a cirurgia com 4J de energia por ponto. Os grupos GC, GP1 e GP4 iniciaram o tratamento 72 horas antecedentes a cirurgia e foram subdivididos em dois períodos experimentais sendo um deles no dia da realização do retalho e o outro juntamente com os demais grupos no sétimo dia pós-operatório. Três dias após a aleatorização os animais foram submetidos a cirurgia do retalho cutâneo randômico. A TFBM foi realizada com um laser de 660 nm com uma potência de 50 mW em três pontos. No primeiro período experimental encontrou-se maior número de vasos, e de mastócitos no GP1 comparado ao GC e maior expressão do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos grupos GP1 e GP4 comparado ao GC. No segundo período experimental o GP1 apresentou menor porcentagem de tecido necrótico, maior número de vasos e porcentagem de células marcadas tanto com VEGF como com fator indutor de hipóxia uma alfa (HIF-1 α) comparado ao GC, detectou-se ainda uma maior marcação de FGF no GP1, GP4 e G4 quando comparado ao controle. Assim, este estudo demonstra que o tratamento preemptivo com a TFBM com a aplicação de 1,1J de energia por ponto é eficaz na melhora da viabilidade do retalho cutâneo.

Palavras Chave: retalho cutâneo, cirurgia plástica, terapia por fotobiomodulação, terapia laser de baixa intensidade, necrose, período pre-operatório, angiogênese.

5.1 INTRODUÇÃO

Uma das técnicas utilizadas na cirurgia plástica reparadora é o retalho cutâneo, que é realizado para cobrir grandes feridas ou falhas teciduais resultantes de lesões como: excisão de tumores, malformação congênita ou ainda para a reconstrução de estruturas faciais como orelha, nariz, lábio e frente [1].

Embora a realização de retalho cutâneo seja uma técnica segura e eficiente, uma das alterações fisiológicas que ocorrem com a elevação do retalho é a redução significativa do fluxo sanguíneo, que leva a uma diminuição das concentrações de nutrientes para a região e pode resultar na necrose da porção distal do retalho [2]. Além disto, a necrose também pode estar relacionada a fatores extrínsecos que incluem condições sistêmicas (infecção, arteriosclerose, hipotensão e mal nutrição) ou locais (compreensão, tensão, trombose ou torção do pedículo) sendo que esses fatores podem ser minimizados por cuidados pré-operatório [3].

Com o intuito de minimizar a necrose do tecidual, alguns estudos utilizaram tratamentos pré-operatórios a realização do retalho cutâneo, dentre os quais, pode-se destacar: tratamento medicamentoso [4,5]; terapia celular [6]; terapia gênica [7,8]; aquecimento e resfriamento do tecido [9] estimulação elétrica transcutânea [10]; ondas de choque extra corpórea [11] e a terapia por fotobiomodulação (TFBM) [12–14].

A TFBM pode ser definida como o uso de fontes de luz não ionizantes com finalidade terapêuticas, no espectro visível e invisível [15]. Essa energia luminosa é absorvida por biomoléculas específicas localizadas nas mitocôndrias, os cromóforos, iniciando assim, uma cascata de reações no citoplasma e na membrana celular [16] que culminam nos efeitos terapêuticos da TFBM, dentre os quais destaca-se: efeito analgésico, circulatório, na modulação de processos inflamatórios e no reparo tecidual [17].

Na literatura é possível encontrar estudos que compararam o efeito da TFBM na viabilidade do retalho quando aplicado pré ou pós-operatório [12–14] e ambas demonstraram ter efetividade equivalente, mas pouco se sabe sobre a utilização desses recursos associando os períodos pré e pós-operatório. A hipótese deste estudo é que existirá diferença entre a associação da TFBM a laser nos períodos pré e pós-operatório. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi investigar os efeitos dos tratamentos preemptivo associado ao tratamento pós-operatório com terapia por fotobiomodulação a laser (660 nm) com diferentes doses na viabilidade em retalhos cutâneos em ratos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 63 animais (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com massa corpórea inicial de 245 a 285 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, campus de São Carlos. O estudo foi previamente aprovado pela comissão de ética no uso de animais pelo número 6224290515 e conduzido de acordo com as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

No terceiro dia antecedente ao procedimento operatório, todos os animais foram aleatorizados por sorteio e alocados em 5 grupos da seguinte maneira (figura 1): Grupo Controle (GC) (n: 15): animais foram submetidos a simulação da TFBM a laser iniciando 72 horas antecedentes a realização do retalho cutâneo; Grupo preemptivo laser 1,1J (GP1) (n: 15): animais foram submetidos a TFMB a laser preemptivo com energia de 1,1J por ponto, iniciando 72 horas antecedentes a realização do retalho cutâneo; Grupo preemptivo laser 4J (GP4) (n: 15): animais foram submetidos TFMB a laser preemptivo com energia de 4J por ponto, iniciando 72 horas antecedentes a realização do retalho cutâneo: Grupo laser 1,1J (G1) (n: 9): animais foram submetidos a TFMB a laser iniciando imediatamente após a realização do retalho cutâneo com energia de 1,1J por ponto e Grupo laser 4J (G4) (n: 9): animais foram submetidos a FMBT a laser iniciando imediatamente após a realização do retalho cutâneo com energia de 4J por ponto.

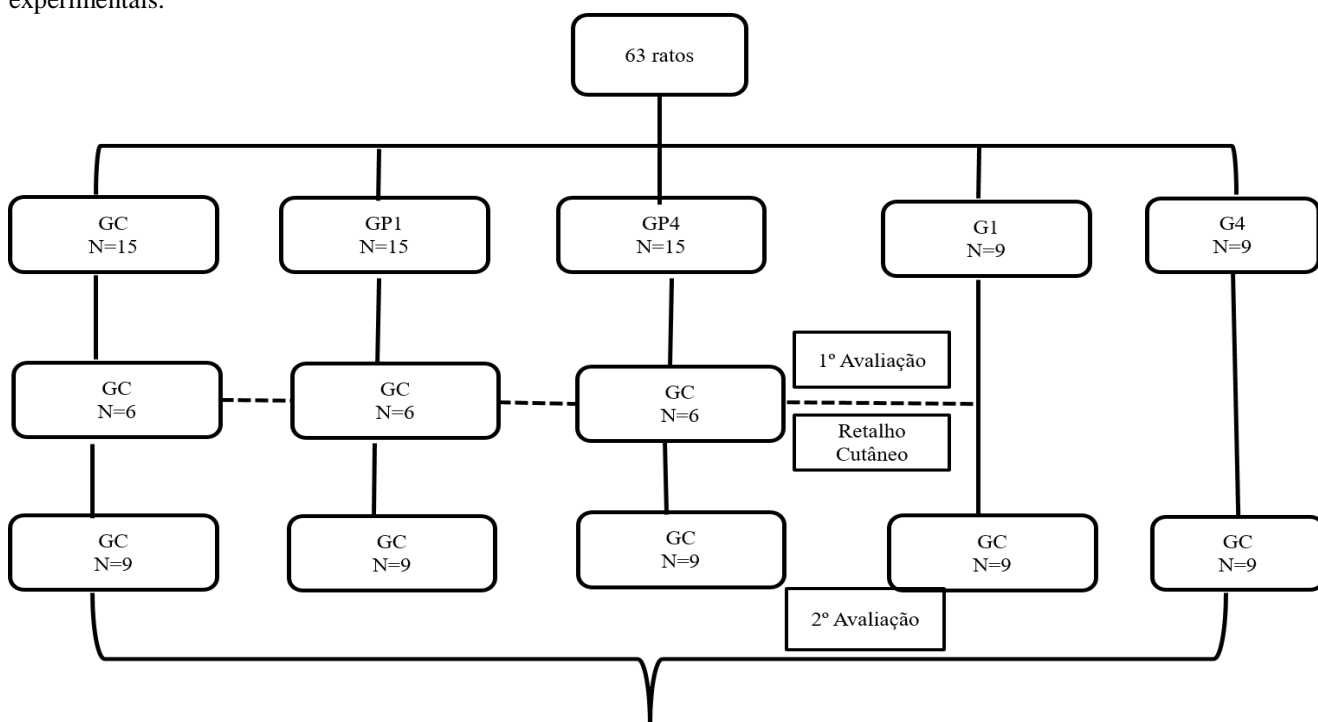
Os animais do GC, GP1 e GP4 foram subdivididos em dois períodos experimentais inicial e final, como pode ser visto na figura 1. No período inicial a coleta foi realizada no dia da realização do retalho cutâneo (6 animais por grupo) com o intuito de identificar alterações histológicas provocadas pela aplicação da preemptivo da TFBM. O período final refere-se a coletado no 7º dia pós-operatório dos animais de todos os grupos.

5.2.3 Terapia por fotobiomodulação a laser

Os animais foram irradiados com um laser de Arseneto de Gálio, Índio, Alumínio e Fósforo (InGaAlP), 660 nm (Photon Laser III, DMC®, São Carlos, SP, Brasil), com potência de 50 mW no modo de emissão contínuo, com parâmetros descritos na tabela 1. O equipamento foi calibrado e aferido pelo fabricante tanto no início como

no final do experimento com o intuito de se obter alta confiabilidade na potência efetiva da emissão do aparelho (ANEXO IV).

Figura 1- Esquema representativo da divisão dos animais nos diferentes grupos e nos diferentes períodos experimentais.



N: numero de animais; GC: grupo controle; GP1: grupo tratado com TFBM a laser com 1,1J Preemptivo; GP4: grupo tratado com TFBM a laser com 4J Preemptivo (GP4); G1: grupo tratado com TFBM A laser a 1,1J; G4: grupo tratado com TFBM a laser com 4J

A irradiação laser foi realizada diariamente com os animais anestesiados, em três pontos na base cranial. Com o intuito de padronizar os pontos de aplicação foi utilizado um molde plástico, colocado sobre o retalho e os pontos eram localizados a 0,25 cm das margens interna do retalho e com uma distância entre os pontos de 0,7 cm como descrito em trabalho anterior [18].

Tabela 1- Parâmetros de Irradiação com TFBM a laser nos diferentes grupos.

Parâmetros[uni]	GC	GP1	GP4	G1	G4
Área do feixe [cm ²]	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
Irradiância [W/cm ²]	0	1,78	1,78	1,78	1,78
Tempo de exposição [seg] *	22	22	80	22	80
Fluência [J/cm ²]	0	40	150	40	150
Energia [J]*	0	1,1	4	1,1	4
Número de pontos irradiados	3	3	3	3	3
Técnica de Aplicação	Contato	Contato	Contato	Contato	Contato
Número e frequência de sessões de tratamento	Dez dias diariamente	Dez dias diariamente	Dez dias diariamente	Sete dias diariamente	Sete dias diariamente
Energia Total[J]#	0	3,3	12	3,3	12

*Parâmetros descritos por ponto irradiado, # Parâmetro descrito por dia de aplicação

5.2.4 Procedimento operatório

Os animais foram pesados e anestesiados proporcionalmente a massa corporal (ketamina 95mg/Kg e xilazina 12 mg/kg - Syntec®) via intraperitoneal e após a indução anestésica foram posicionados com a extensão dos quatro membros e tiveram seus dorsos epilados digitalmente. Na sequência foi demarcado o local onde realizou-se o retalho cutâneo randômico de base cranial [19] com o auxílio de um molde plástico com dimensões de 10 cm de comprimento e 4 cm de largura, respeitando como limite superior aos ângulos inferiores das escápulas.

Uma barreira plástica com as mesmas dimensões do retalho foi interposta entre o retalho e o leito doador, impedindo a revascularização dos retalhos por meio dos vasos do leito. Em seguida, foi retornando o retalho a posição de origem e realizada a sutura com fio de náilon 4-0, com distância de aproximadamente um cm entre os pontos. Para minimizar o desconforto pós-operatório, os animais receberam analgésico via subcutânea imediatamente após o procedimento operatório e durante cinco dias após a realização do retalho.

5.2.5 Eutanásia dos animais

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica (ketamina 285mg/kg e xilasina 36mg/kg), de acordo com o período experimental ao qual o animal foi alocado e uma amostra do tecido cutâneo foi coletado no local de aplicação do laser.

5.2.6 Preparação do material para análises

O material coletado foi armazenado em soluções de formaldeído a 10% para a fixação por 24 horas. Passado esse tempo, ele foi processado, incluído em parafina e cortado com uma espessura de 5 µm com um micrótomo rotativo, Spencer – 820.

5.2.7 Análises

5.2.8 Cálculo da Área de Necrose dos Retalhos

O cálculo da porcentagem do tecido necrótico foi realizado no 7º dia pós-operatório, com o método do gabarito de papel que foi descrita inicialmente por Sasaki e Pang em 1980[20] e é atualmente utilizado[18,21,22]. Para isso, traçou-se um molde do retalho em papel vegetal e se delimitou a área necrosada (pele escurecida, fria e sem pelos) e a área viável (pele macia, rósea, quente e com pelos) do retalho. O molde de papel vegetal correspondente ao retalho foi pesado em uma balança de precisão (erro de +/- 0,0001g) e em seguida a área de necrose foi separada da área viável do molde e também teve seu peso aferido.

Para se encontrar a porcentagem da área de necrose foi aplicada a seguinte equação:

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

5.2.9 Morfometria de Mastócitos e de Vasos Sanguíneos

As amostras de pele incluídas em parafina foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com Azul de Toluidina, coloração essa que possibilita tanto a contagem de mastócitos como de vasos.

Todas as lâminas foram escaneadas em um *Scanner* de Lâminas Histológicas Panoramic Desk da (3D Histech) no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética – UFSCar. Posteriormente realizou-se a captura de 10 imagens em um aumento de 400 x com o auxílio do *software* Pannoramic Viewer (3D Histech). As imagens foram analisadas por dois avaliadores independentemente, sendo considerado para a contagem apenas os mastócitos e os vasos presentes integralmente na imagem. Para a análise estatística considerou-se a média aritmética de cada lâmina.

5.2.10 Imunoistoquímica

As amostras destinadas a essa análise foram desparafinizadas e reidratadas em banhos de xilol e etanol graduado. Após a rehidratação, foi realizado a recuperação

antigênica com tampão de ácido cítrico 0,01 M (pH 6) por três minutos em um Steamer (potência de 850 W). Ao final desse tempo o material foi incubado por 12 minutos. Em seguida os cortes foram pré-incubados com peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução salina tamponada com PBS por 10 min e então foram bloqueadas com 5% de soro em solução de PBS durante 10 min. Posterior ao bloqueio da peroxidase as amostras foram incubadas com anticorpos primários, descritos na tabela 2, por um tempo de duas horas. Logo em seguida, deu-se a aplicação de anticorpo secundário (kit ABC, PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1: 5 durante 30 min. A detecção colorimétrica foi realizada com um substrato diaminobenzidina (DAB, SK-4100, os laboratórios Vector, Burlingame, CA, EUA) e hematoxilina.

Tabela 2- Especificações dos anticorpos utilizados na imunistoquímica.

Anticorpo	Fabricante/Referência	Diluição
Fator Indutor de Hipóxia (HIF - 1 α)	Santa Cruz Biotechnology/sc – 13513	1:700
Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF)	Santa Cruz Biotechnology/sc – 1884	1:500
Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	Santa Cruz Biotechnology/sc-53462	1:1500

As lâminas foram escaneadas em um Scanner de Lâminas Histológicas Panoramic Desk (3D Histech, Hungria) e posteriormente realizou-se as análises qualitativa e quantitativa. A análise qualitativa foi realizada em um aumento de 400 x no *software* Panoramic Viewer (3D Histech Hungria) avaliando a presença e a região da imunomarcção. Para a análise quantitativa capturou-se 5 imagens de cada lâmina em um aumento de 200x e as imagens foram quantificadas no *software ImageJ* quanto a porcentagem de pixels da área marcada foi com a decodificação das cores em H&E DAB[23]. As médias aritméticas dos valores em pixel das amostras foram utilizadas para a análise estatística.

5.2.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de técnicas descritivas, em gráficos e tabelas, na forma de média e desvio padrão. A normalidade dos dados foi testada com Shapiro Wilk e a homogeneidade com o teste de Levene. Para casos com dados não normais ou não homogêneos (FGF e VEGF na primeira avaliação) foi realizado o teste de Kruskal Wallis e na presença de diferença estatisticamente significativa ($\alpha \leq 0,05$) foi realizado o *post-hoc* de Mann-Whitney com alfa ajustado. Para dados normais e com

distribuição homogênea (demais variáveis) foi realizada a análise de variância ANOVA-*One way* e na presença de diferença significativa foi aplicado o teste de *post-hoc* Tukey.

O grau de concordância entre os avaliadores para as variáveis: contagem de vasos e mastócitos foi testado com o coeficiente de correlação intraclassa (ICC) e para a interpretação da força de correlação entre os avaliadores utilizou-se a interpretação proposta por Koo e Li [24] onde os autores relatam que valores de ICC inferiores a 0,5 são indicativos de baixa confiabilidade, valores entre 0,5 e 0,75 indicam confiabilidade moderada, valores entre 0,75 e 0,90 indicam boa confiabilidade e valores maior que 0,90 indicam excelente confiabilidade.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Primeira Avaliação

5.3.1.1 Morfometria de mastócitos e de vasos

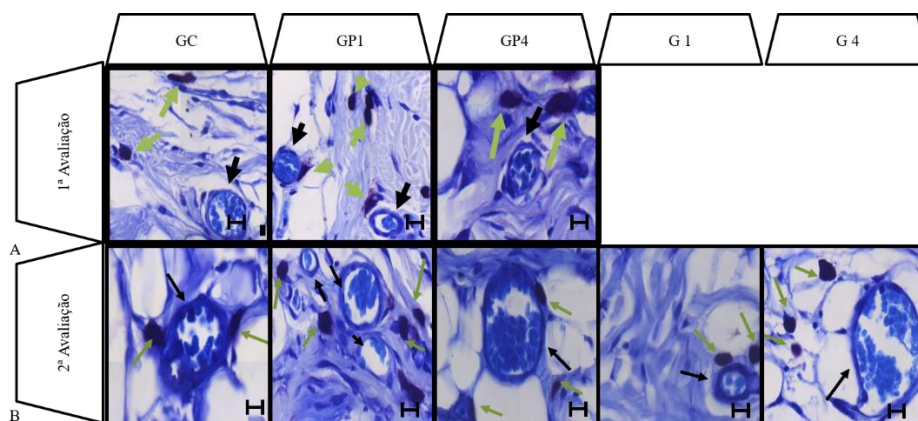
Para essas variáveis encontrou-se uma concordância entre os avaliadores com ICC de 0,990 para mastócito e 0,972 para vasos. Detectou-se um aumento estatisticamente significativo tanto no número de vasos ($p= 0,009$) como no número de mastócito ($p= 0,023$) e para essas duas variáveis do GP1 em relação do GC, como pode ser visto na tabela 3 e figura 1-A.

Tabela 3-Resultados da primeira avaliação

Variáveis	GC	GP1	GP4	GCxGP1	GCXGP4	GP1XGP4
Vasos	1,45± 0,37	2,76±0,86	1,75±0,36	0,008*	0,715	0,060
Mastócitos	4,15±1,15	6,5±1,08	6,32±1,54	0,038*	0,054	0,980
% FGF	19,73±1,69	28,15±12,30	30,14±3,59	0,047*	0,009*	0,347
% HIF	24,56±9,15	28,82±6,9	30,36±4,25	0,658	0,945	0,447
% VEGF	20,71±0,74	27,64±2,56	29,85±4,82	0,014*	0,009*	0,623

Os valores estão expressos em média e \pm desvio padrão. GC: grupo controle, GP1: grupo irradiado com 1,1J e GP4 grupo irradiado com 4J. * diferença estatisticamente significantes

Figura 2 - Fotomicrografia representativa de vaso e mastócito na primeira e segunda avaliação nos diferentes grupos avaliados



Resultados ilustrativo da morfometria de vaso e mastócito. A- imagens da primeira avaliação B- imagens da segunda avaliação. GC: Grupo Controle; GP1: TFBM Preemptivo a laser com 1,1J; GP4: TFBM Preemptivo a laser com 4J; G1: grupo tratado com TFBM pós-operatório com energia 1,1J; flechas pretas vasos e verdes mastócitos (Barra 20 μ m).

5.3.1.2 Expressão Proteica por Imunoistoquímica

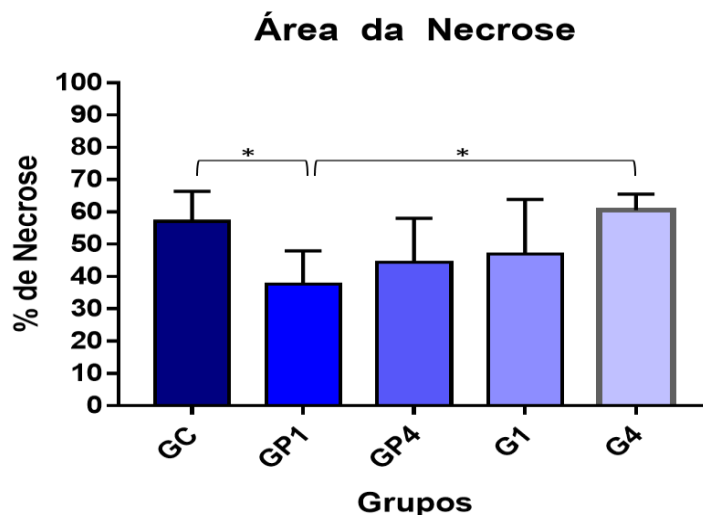
Na figura 2-A é possível observar a imunomarcagem citoplasmática do FGF, enquanto na figura 2-C ressalta-se a marcação do VEGF e na figura 2-B demonstra-se a marcação predominantemente no núcleo das células do HIF-1 α . Na análise quantitativa das células imunomarcadas foi encontrado diferença para o VEGF ($p=0,003$). Não se detectou diferença entre os grupos para os marcadores FGF ($p=0,105$) e HIF 1 α ($p=0,464$). Ambos os grupos tratados apresentaram maiores valores para o VEGF, como pode ser visto na tabela 3.

5.3.2 Segunda Avaliação

5.3.2.1 Área da Necrose

Foi possível encontrar diferença estatística entre os grupos ($p=0,001$), sendo ela entre o GC e o GP1 ($p=0,009$) e do GP1 com o G4 ($p=0,001$). O grupo que apresentou menor área de necrose o GP1 como pode ser visto na figura 3.

Figura 3 - Gráfico representativo dos resultados da comparação entre os grupos para a variável área da necrose.

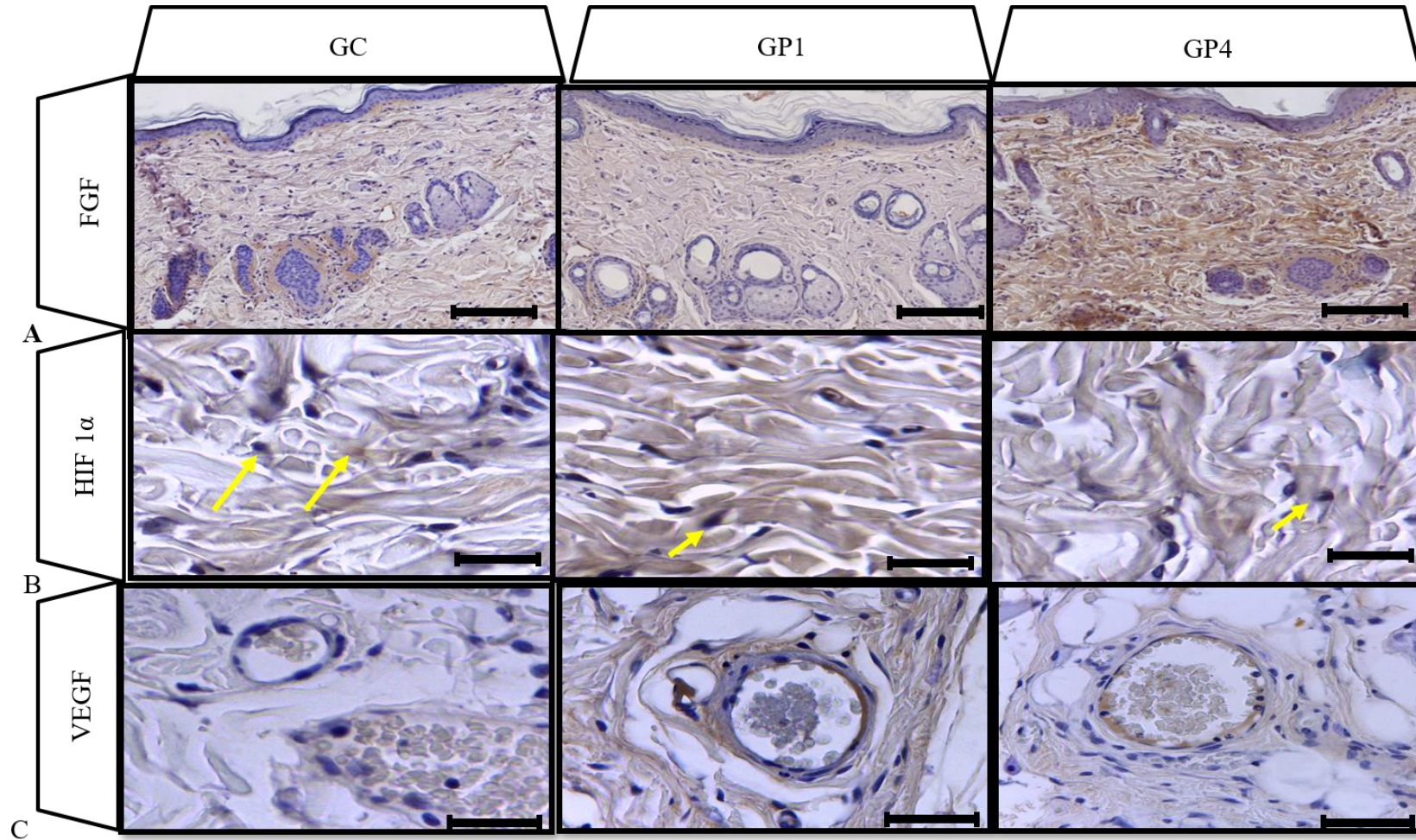


* diferença estatisticamente significante; GC: grupo controle; GP1: grupo tratado com TFBM a laser com 1,1J Preemptivo; GP4: grupo tratado com TFBM a laser com 4J Preemptivo (GP4); G1: grupo tratado com TFBM A laser a 1,1J; G4: grupo tratado com TFBM a laser com 4J

5.3.2.2 Morfometria de mastócitos e de vasos

Houve diferença significativa na morfometria de vaso ($p=0,05$), sendo que os animais do GP1 obtiveram mais vasos que os animais do GC ($p=0,028$) como pode ser visto na tabela 4 e figura 1-B. Não houve diferença estatisticamente significante entre os números de mastócitos nos diferentes grupos.

Figura 4 - Fotomicrografias representativa das análises de Imunoistoquímica do tecido cutâneo dos grupos experimentais na primeira avaliação



Resultados ilustrativo da análise qualitativa da imunoistoquímica do A- FGF, B- HIF 1 α e C- VEGF. GC: Grupo Controle; GP1: TFBM Preemptivo a laser com 1,1J ;GP4: TFBM Preemptivo a laser com 4J (GP4), flechas pretas vasos e amarelas marcação de núcleo (Barra 50 μ m).

5.3.2.3 Expressão Proteica por Imunoistoquímica

A figura 4 demonstra a análise imunoistoquímica, sendo que a figura 4- A demonstra a marcação realizada pelo FGF, na figura 4- C a imunomarcação do VEGF e na figura 4- B destaca-se a marcação do HIF-1 α . Houve diferença estatística entre os grupos nos marcadores avaliados FGF ($p < 0,001$), VEGF ($p = 0,034$) e HIF 1 α ($p = 0,038$). Para o FGF essa diferença se deu entre o GC com os grupos GP1,1J ($p < 0,001$), GP4J ($p = 0,001$) e G4 ($p = 0,046$), sendo que nos grupos tratados maiores porcentagens de marcação foram observadas. Houve ainda diferença significativa entre o GP1 e G1 ($p = 0,035$) em que os animais tratados previamente apresentaram melhores resultados.

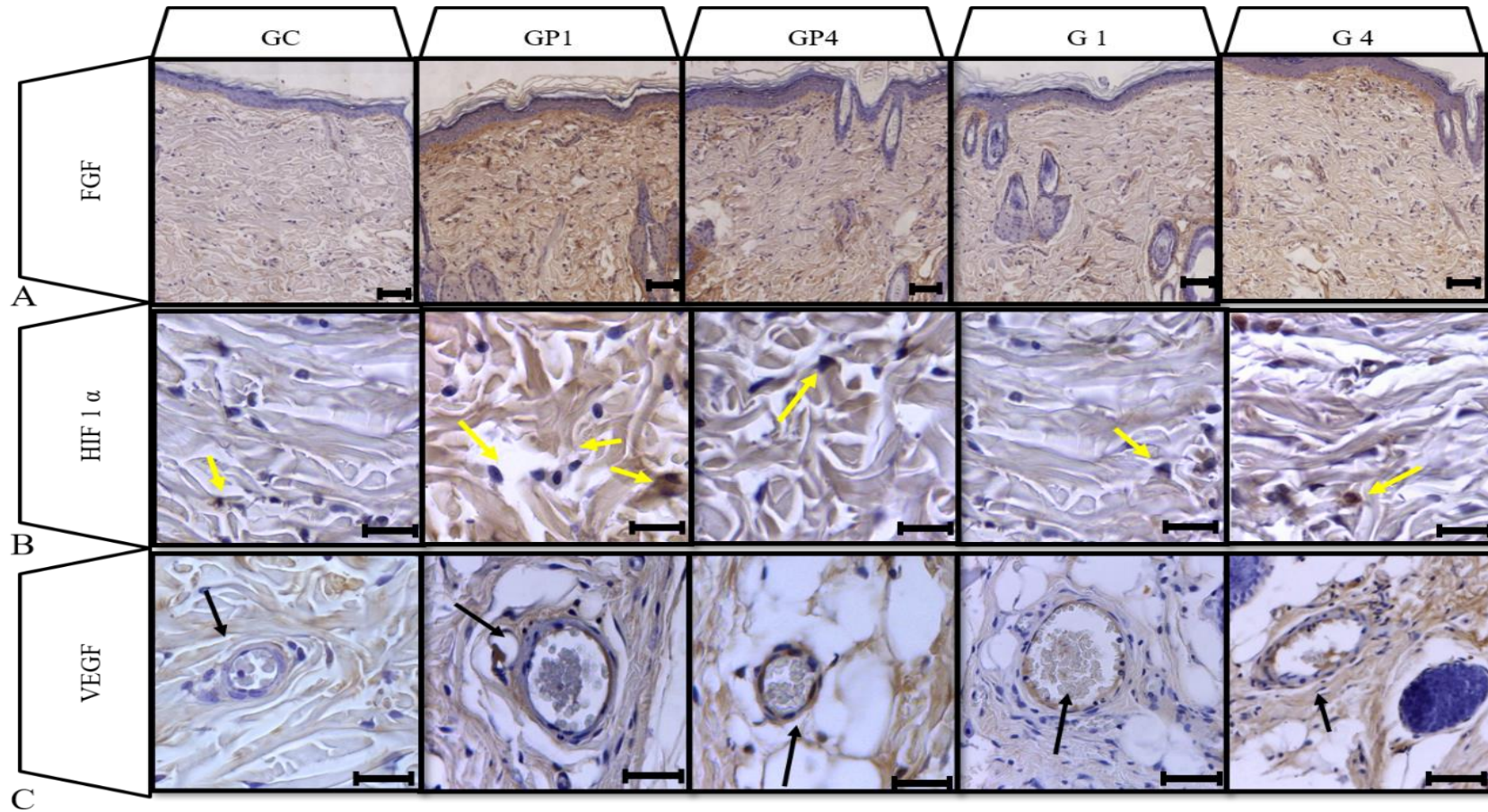
Em relação a imunexpressão do VEGF houve diferença apenas entre o GC e o GP1 ($p = 0,32$) sendo esse último o grupo que apresentou maior valores imunomarcação dessa proteína. Também se encontrou diferença ($p = 0,044$) entre os grupos a cima citados para o marcador HIF-1 α . Os valores das médias e desvios padrão desses marcadores encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da segunda avaliação nos diferentes grupos

Variáveis	GC	GP1	GP4	G1	G4
% de necrose	57,09 \pm 9,29	37,62 \pm 10,33*	44,49 \pm 13,56	46,97 \pm 16,88	60,56 \pm 4,93#
Vasos	1,40 \pm 0,31	2,65 \pm 0,54*	2,24 \pm 0,19	2,20 \pm 0,87	1,97 \pm 0,58
Mastócitos	5,0 \pm 0,62	4,68 \pm 0,85	4,71 \pm 1,02	5,24 \pm 0,90	5,02 \pm 1,34
% FGF	23,96 \pm 7,1	40,54 \pm 1,74*	38,54 \pm 4,1*	31,87 \pm 4,48#	32,82 \pm 4,48*
% HIF-1 α	27,55 \pm 3,97	37,61 \pm 2,17*	34,30 \pm 5,09	29,73 \pm 7,97	30,59 \pm 3,71
% VEGF	21,41 \pm 9,23	37,16 \pm 5,75*	35,43 \pm 4,9	33,59 \pm 9,57	33,25 \pm 8,02

*Diferença estatística em relação ao grupo controle $p \leq 0,05$; & diferença estatística em relação ao grupo G1; # Diferença estatística com o GP1.

Figura 53 - Fotomicrografias representativa dos grupos experimentais na segunda avaliação



Resultados ilustrativo da análise qualitativa da imunistoquímica do A- FGF, B- HIF 1 α e C- VEGF. GC: Grupo Controle; GP1: TFBM Preemptivo a laser com 1,1J ;GP4: TFBM Preemptivo a laser com 4J; G1: grupo tratado com TFBM pós operatório com energia 1,1J; G1: grupo tratado com TFBM pós operatório com energia 4J; flechas pretas vasos e amarelas marcação de núcleo (Barra 50 μ m).

5.4 DISCUSSÃO

Dentre as opções de tratamento que objetivam o aumento do fluxo sanguíneo para a região distal do retalho está a TFBM a laser [12,25], mas até o momento pouco se sabe sobre o uso dessa modalidade terapêutica associando a irradiação nos momentos pré e pós-operatório. Em nossa pesquisa foram associados esses momentos de aplicação e foi detectado na primeira avaliação que a TFBM a laser antes da realização do retalho cutâneo levou a um aumento no número de vasos e de mastócito no GP1 além de uma maior porcentagem de célula marcada tanto para o FGF como para o VEGF independente do grupo irradiado. Na segunda avaliação encontramos um aumento da marcação do FGF independentemente do grupo avaliado, mas apenas no GP1 houve um aumento na HIF-1 α , VEGF, no número de vasos e uma diminuição na área de necrose.

Diferentemente de nossos achados, o estudo de Smith et al. [14] não encontrou alterações entre os grupos irradiados com TFBM a laser associando as irradiações nos momentos pré e pós-operatório. Na ocasião os autores compararam o grupo controle com um grupo irradiado a laser com 632,8 nm por 10 dias consecutivos, (5 pré-operatório e 5 pós-operatório) com uma dose 0,0825J. Deve-se levar consideração que a energia entregue ao tecido no trabalho deles foi pequena e que doses (fluência, irradiância, tempo de exposição ou número de repetições) muito baixas ou muito altas podem levar a nenhum efeito, ou ainda um efeito inibitório, respectivamente [26,27].

Pesquisas [12,13] comparando grupos irradiados previamente ou apenas no período posterior a realização de cirurgia plástica com grupo controle, demonstraram que a TFBM a laser foi eficiente para a diminuição da necrose, mas que os grupos irradiados nos diferentes momentos não diferiram entre si. Em nosso estudo constatamos que a irradiação associando os períodos pré e pós-operatório foi eficiente para o aumento de número de vasos e a diminuição da necrose, enquanto que o grupo tratado com a mesma dose unicamente no período pós-operatório não diferiu do controle. Constatamos ainda que a irradiação realizada previamente serviu como um estímulo para o aumento dos vasos, sendo esse um dos fatores que pode ter contribuído para esse resultado.

O aumento no número de vasos é um fator importante para diminuição da área da necrose [28,29]. Na pesquisa realizada por Bossini et al (2009) [28] os autores concluíram que os efeitos da TFBM a laser nessa variável era independente dos parâmetros de irradiação. Por outro lado, em nossa pesquisa assim como na de CURY et al (2013), observa-se que o efeito

modulatório na formação de vasos é dependente dos parâmetros. Os fatos que podem levar a essa discordância entre os resultados dos estudos é a potência de irradiação empregada nos 3 estudos terem sido diferentes (30, 40 e 50 mW respectivamente), além dos valores de energia também diferirem. Portanto, é possível concluir que as alterações causadas no número de vasos é dose dependente.

A formação de novos vasos está envolvido em uma variedade de eventos fisiológicos que podem auxiliar no reparo de tecido cutâneo, sendo esse processo regulado por alguns fatores de crescimento [30] dentre eles, o VEGF e o FGF-2 [31,32]. Nesse estudo foi detectado o efeito estimulatório da TFBM a laser nos fatores a cima citados bem como um aumento no número de vaso.

Pesquisa utilizando fatores de crescimento como o FGF [31,33] e o VEGF [7,8] demonstraram resultados positivos para o aumento no número de vaso e da viabilidade do retalho cutâneo. Na literatura encontram-se evidências de que a TFBM a laser atua modulando esses dois fatores de crescimento [23,34–37]. Esses dados corroboram com o encontrado nesta pesquisa, uma vez que o grupo irradiado por 10 dias e com uma dose de 1,1J por ponto apresentou efeito estimulatório tanto para o FGF como para o VEGF, um maior número de vasos e menor porcentagem de tecido necrótico. Sugere-se que a irradiação prévia com essa dose foi fundamental para esses efeitos, uma vez que o grupo irradiado com a mesma dose apenas no período pós-operatório não demonstrou diferença nessas variáveis.

Um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo aumento do VEGF após a TFBM a laser pode ter sido o aumento do HIF-1 α [36], que é um fator crítico de transcrição que regula as respostas adaptativas à hipóxia[38] e sinaliza o aumento na produção do VEGF [32]. Assim como em nosso estudo, na pesquisa de Cury et al.[36] foi possível encontrar um aumento nas concentrações de HIF-1 α após a irradiação com laser, sugerindo que a TFBM a laser modulou vias moleculares que induziram a otimização do HIF-1 α e consequentemente o VEGF.

Tem se estudado a importância dos mastócitos modulando diferentes mediadores biológicos responsáveis por estimular o crescimento, migração e proliferação de elementos essenciais para o reparo da pele [39,40]. Neste estudo encontrou-se um aumento no número de mastócito na primeira avaliação, esse fato pode ter contribuído para a limpeza microbiológica do local no período do pós-operatório imediato. Estudos realizados avaliando o número de mastócito após a TFBM no sétimo dia pós-operatório [35,41,42] obtiveram um aumento dessas células, diferentemente do encontrado em nossa segunda avaliação. Essa discordância pode ter se dado devido ao local em que a amostra do tecido foi coletada, pois

Nishioka et al. [42] relataram em seu estudo que o número de mastócitos foi maior próximo a linha de transição entre o tecido viável e necrótico.

Na maioria dos estudos realizados até o momento [18,43,44] foi relatado um efeito benéfico para o aumento da viabilidade do retalho cutâneo com a aplicação da TFBM a laser no período pós-operatório, diferentemente do encontrado em nosso estudo. Uma das explicações plausível para essa discordância seria a realização da epilação dos animais de nosso trabalho ter sido feita 3 dias antecedentes a realização do retalho, sendo que nos estudos citados anteriormente a epilação aconteceu no momento do procedimento cirúrgico. Outro fator muito importante que deve ser considerado é que o número de aplicações da TFBM usado em nosso estudo foi o maior, pois a maioria dos estudos realizam a irradiação por um período de cinco [18,44] ou três dias [43,45] enquanto em nosso estudo essa se deu por sete dias após a realização do retalho, podendo ter causado uma sobrecarga energética.

Acredita-se que a falta de um grupo com tratamento apenas preemptivo auxiliaria para esclarecer se a melhora apresentada no GP1 foi unicamente devido ao tratamento pré-operatório ou se ela foi causada por um maior número de aplicações do tratamento.

5.5 Conclusão

A aplicação do laser preemptivo com 1,1J por ponto em retalho cutâneo randômico é uma modalidade terapêutica eficaz para a diminuição da porcentagem de tecido necrótico, aumento no número de vasos e na imuno marcação do FGF, HIF 1 α e VEGF.

5.6 Agradecimentos

Agradecemos as contribuições da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (projeto 2015/13501-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ (309308 / 2017-8) pelo apoio financeiro da presente pesquisa.

5.7 Referência Bibliográfica

- [1] N. Huang, A. Khan, H. Ashrafpour, P.C. Neligan, C.R. Forrest, C.D. Kontos, C.Y. Pang, A. Khan, H. Ashrafpour, P.C. Neligan, C.R. Forrest, C.D. Kontos, C.Y. Pang, Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability, 8 (2006). doi:10.1152/ajpheart.01253.2005.

- [2] J.B. Lucas, *The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps*, *Facial Plast. Surg. Clin. NA.* (2017). doi:10.1016/j.fsc.2017.03.003.
- [3] C.. KERRIGAN, *Skin flap failure: pathophysiology*, *Plast Reconstr Surg.* 72 (1983) 766–777.
- [4] H. Şen, M. Oruç, V.M. Işık, M. Sadiç, H. Sayar, R. Çitil, M. Korkmaz, U. Koçer, *The Effect of Omeprazole Usage on the Viability of Random Pattern Skin Flaps in Rats*, *Ann. Plast. Surg.* 78 (2017) e5–e9. doi:10.1097/SAP.0000000000000922.
- [5] C. Burusapat, J. Paengnoi, K. Satayasontorn, *An experimental study of the effect of pre-operative administration of cilostazol on random skin flap survival in rats: double blinded randomized controlled trial*, *Ann. Surg. Innov. Res.* 9 (2015) 2. doi:10.1186/s13022-015-0011-4.
- [6] M. Yang, L. Sheng, H. Li, R. Weng, Q.-F. Li, *Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model.*, *Microsurgery.* 30 (2010) 275–81. doi:10.1002/micr.20779.
- [7] N. Huang, A. Khan, H. Ashrafpour, P.C. Neligan, C.R. Forrest, C.D. Kontos, C.Y. Pang, *Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H127-37. doi:10.1152/ajpheart.01253.2005.
- [8] W. Chen, D. Yang, P. Wang, S. Gao, X. Zhang, T. Wang, *Microencapsulated myoblasts transduced by the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene for the ischemic skin flap.*, *Aesthetic Plast. Surg.* 35 (2011) 326–32. doi:10.1007/s00266-010-9610-y.
- [9] A.M. Salmi, C. Hong, J.W. Futrell, *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. Surg. Hand Surg.* 33 (1999) 163–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10450572> (accessed March 1, 2019).
- [10] F. Doğan, İ. Özyazgan, *Flap Preconditioning by Electrical Stimulation as an Alternative to Surgical Delay: Experimental Study.*, *Ann. Plast. Surg.* 75 (2015) 560–4. doi:10.1097/SAP.0000000000000162.
- [11] H. Keil, W. Mueller, C. Herold-Mende, M.M. Gebhard, G. Germann, H. Engel, M.A. Reichenberger, *Preoperative shock wave treatment enhances ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis in a rat skin flap model.*, *Int. J. Surg.* 9 (2011) 292–6. doi:10.1016/j.ijssu.2011.01.003.
- [12] T. Kami, Y. Yoshimura, T. Nakajima, T. Ohshiro, T. Fujino, *Effects of low-power diode lasers on flap survival.*, *Ann. Plast. Surg.* 14 (1985) 278–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3994272> (accessed February 26, 2019).
- [13] M. Calis, A.T.T. Demirtas, G. Sert, G. Irmak, *Photobiomodulation With Polychromatic*

- Light Increases Zone 4 Survival of Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap, (2019) 1–12. doi:10.1002/lsm.23063.
- [14] R.J. Smith, M. Birndorf, G. Gluck, D. Hammond, W.D. Moore, The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models., *Plast. Reconstr. Surg.* 89 (1992) 306–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732900> (accessed February 26, 2019).
- [15] J.J. Anders, Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy 1, 33 (2015) 183–184. doi:10.1089/pho.2015.9848.
- [16] P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam, D. Vecchio, Z. Pam, N. Pam, M.R. Hamblin, Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring., *Semin. Cutan. Med. Surg.* 32 (2013) 41–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049929> (accessed February 25, 2019).
- [17] V. Heiskanen, M.R. Hamblin, Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes?, *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (2018) 1003–1017. doi:10.1039/c8pp00176f.
- [18] C.C.S. Martignago, C.R. Tim, L. Assis, L.M.G. Neves, P.S. Bossini, A.C. Renno, L.R.S. Avo, R.E. Liebano, N.A. Parizotto, Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats., *Lasers Med. Sci.* (2018). doi:10.1007/s10103-018-2694-3.
- [19] R.M. MCFARLANE, G. DEYOUNG, R.A. HENRY, the Design of a Pedicle Flap in the Rat To Study Necrosis and Its Prevention., *Plast. Reconstr. Surg.* 35 (1965) 177–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14264468>.
- [20] G.H. Sasaki, C.Y. Pang, Hemodynamics and Viability of Acute Neurovascular Island Skin Flaps in Rats, *Plast. Reconstr. Surg.* 65 (1980) 152–158.
- [21] M. Karimipour, V. Amanzade, N. Jabbari, G.H. Farjah, Effects of gamma-low dose irradiation on skin flap survival in rats, *Phys. Medica.* 40 (2017) 104–109. doi:10.1016/j.ejmp.2017.07.019.
- [22] C.R. Tim, C.C.S. Martignago, V.R. Da Silva, E.C.B. Dos Santos, F.N. Vieira, N.A. Parizotto, R.E. Liebano, A Comparison of Three Methods for the Analysis of Skin Flap Viability: Reliability and Validity, *Adv. Wound Care.* 7 (2018) 1–7. doi:10.1089/wound.2017.0758.
- [23] A.N. Otterço, A.L. Andrade, P. Brassolatti, K.N.Z. Pinto, H.S.S. Araújo, N.A. Parizotto, Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 183 (2018) 22–29. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.04.010.
- [24] T.K. Koo, M.Y. Li, A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research, *J. Chiropr. Med.* 15 (2016) 155–163. doi:10.1016/j.jcm.2016.02.012.

- [25] J. Kubota, Effects of Diode Laser Therapy on Blood Flow in, (2002) 146–153.
- [26] Y.Y. Huang, A.C.H. Chen, J.D. Carroll, M.R. Hamblin, Biphasic dose response in low level lighththerapy, *Dose-Response*. 7 (2009) 358–383. doi:10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.
- [27] M.R. Hamblin, Y.Y. Huang, S.K. Sharma, J. Carroll, Biphasic dose response in low level light therapy - an update, *Dose-Response*. 9 (2011) 602–618. doi:10.2203/dose-response.11-009.Hamblin.
- [28] P.S. Bossini, R. Fangel, R.M. Habenschus, A.C. Renno, Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats, (2009) 209–213. doi:10.1007/s10103-008-0551-5.
- [29] V. Cury, The Effects of 660 nm and 780 nm Laser Irradiation on Viability of Random Skin Flap in Rats, 27 (2009) 721–724.
- [30] P. Polverini, A fisiopatologia da angiogênese. - PubMed - NCBI, (1995). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8785263> (accessed March 3, 2019).
- [31] C. Rinsch, P. Quinodoz, B. Pittet, N. Alizadeh, D. Baetens, D. Montandon, P. Aebischer, Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia, 2 (2001) 523–533.
- [32] P. Bao, A. Kodra, M. Tomic-Canic, M.S. Golinko, H.P. Ehrlich, H. Brem, The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing, *J. Surg. Res.* 153 (2009) 347–358. doi:10.1016/j.jss.2008.04.023.
- [33] E. Fayazzadeh, H. Yavarifar, S.R. Rafie, S. Motamed, Fibroblast Growth Factor-1 vs . Fibroblast Growth Factor-2 in Ischemic Skin Flap Survival in a Rat Animal Model, 5 (2016) 274–279.
- [34] C.C.S. Martignago, R.F. Oliveira, D.A.A. Pires-Oliveira, P.D. Oliveira, C. Pacheco Soares, P.S. Monzani, R.C. Poli-Frederico, Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice, *Lasers Med. Sci.* 30 (2015) 203–208. doi:10.1007/s10103-014-1644-y.
- [35] L.M.S. das Neves, G. de P.M.F. Leite, A.M. Marcolino, C.E. Pinfieldi, S.B. Garcia, J.E. de Araújo, E.C. de O. Guirro, Laser photobiomodulation (830 and 660 nm) in mast cells, VEGF, FGF, and CD34 of the musculocutaneous flap in rats submitted to nicotine, *Lasers Med. Sci.* 32 (2017) 335–341. doi:10.1007/s10103-016-2118-1.
- [36] V. Cury, A.I. Moretti, L. Assis, P. Bossini, J.S. Crusca, C.B. Neto, R. Fangel, H.P. de Souza, M.R. Hamblin, N.A. Parizotto, Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1alpha and MMP-2, *J.Photochem.Photobiol.B.* 125 (2013) 164–170.

- [37] F.G. Basso, C.F. Oliveira, C. Kurachi, J. Hebling, C.A.D.S. Costa, Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro, *Lasers Med. Sci.* 28 (2013) 367–374. doi:10.1007/s10103-012-1057-8.
- [38] I.R. Botusan, V.G. Sunkari, O. Savu, A.I. Catrina, J. Grunler, S. Lindberg, T. Pereira, S. Yla-Herttuala, L. Poellinger, K. Brismar, S.-B. Catrina, Stabilization of HIF-1 is critical to improve wound healing in diabetic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 19426–19431. doi:10.1073/pnas.0805230105.
- [39] C. Noli, A. Miolo, The mast cell in wound healing, *Vet. Dermatol.* 12 (2001) 303–313. doi:10.1046/j.0959-4493.2001.00272.x.
- [40] G.J. Younan, Y.I. Heit, P. Dastouri, H. Kekhia, W. Xing, M.F. Gurish, D.P. Orgill, Mast Cells Are Required in the Proliferation and Remodeling Phases of Microdeformational Wound Therapy, *Plast. Reconstr. Surg.* 128 (2011) 649e–658e. doi:10.1097/PRS.0b013e318230c55d.
- [41] C.E. Pinfildi, R.E. Liebano, B.S. Hochman, M.M.M.S.S. Enokihara, R. Lippert, R.C. Gobbato, L.M. Ferreira, Effect of Low-Level Laser Therapy on Mast Cells in Viability of the Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap, *Photomed. Laser Surg.* 27 (2009) 337–343. doi:10.1089/pho.2008.2295.
- [42] M.A. Nishioka, C.E. Pinfildi, T.R. Sheliga, V.E. Arias, H.C. Gomes, L.M. Ferreira, LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: Angiogenesis and mast cells on transition line, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 1045–1050. doi:10.1007/s10103-011-1042-7.
- [43] C.S. Baldan, A. Pasqual, Marques, A. Maria, Schiavinato, C. Aparecida, Raquel, The effects of different doses of 670 nm diode laser on skin flap survival in rats, *Acta Cirúrgica Bras.* 27 (2012) 155–161. doi:10.1590/S0102-86502012000200010.
- [44] L.M.S. das Neves, A.M. Marcolino, R.P. Prado, T. De Souza Ribeiro, C.E. Pinfildi, J.A. Thomazini, Low-Level Laser Therapy on the Viability of Skin Flap in Rats Subjected to Deleterious Effect of Nicotine., *Photomed. Laser Surg.* X (2011) 1–7. doi:10.1089/pho.2010.2883.
- [45] I. Esteves, I.B. Masson, C.T.F. Oshima, A.P.R. Paiotti, R.E. Liebano, H. Plapler, Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 655–660. doi:10.1007/s10103-011-1011-1.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados nesta tese foi possível concluir que:

- O número de pontos em que um mesmo tempo de irradiação total é entregue ao tecido interfere no resultado do tratamento;
- A irradiação em um menor número de pontos e maior tempo por ponto foi mais eficiente para o aumento da viabilidade e da quantificação de fibras do colágeno em retalhos cutâneo;
- Os resultados da aplicação da TFBM a laser em animais nas condições de homeostasia são dose dependente para o número de vasos e mastócitos, sendo a dose que apresentou melhor resultado foi a de 1,1 J por ponto, já para a expressão proteica detectou-se um aumento da marcação, tanto do FGF como do VEGF, independente do grupo irradiado.
- A aplicação preemptiva da TFBM a laser na dose de 1,1 J por ponto demonstrou ser efetiva para mudanças no número de vasos, além de uma maior marcação histoquímica dos fatores HIF-1 α , FGF e VEGF.
- A aplicação preemptiva associada ao tratamento pós-operatório com TFBM a laser pode ser uma alternativa para a prevenção da instauração da necrose distal do RC.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Além dos estudos apresentados nessa obra há dois artigos sobre a aplicação da TFBM a laser na viabilidade do RC que foram desdobramentos desta pesquisa. Um deles está em fase de finalização da redação e o outro em fase de análise de resultados.

A pesquisa que se encontra em fase de escrita foi realizada antes do segundo artigo apresentado nessa tese e teve como objetivo identificar a melhor potência de irradiação para o aumento da viabilidade do RC. No estudo em questão foi possível concluir que a potência de 50mW foi melhor que a de 100mW e que o grupo controle, visto que detectou-se diminuição na área da necrose, além de uma menor expressão proteica da Caspase 3 nos grupos tratados com 50 mW.

Já o segundo estudo que está em fase de análise de resultados, foi realizado com um aluno de iniciação científica, o qual a doutoranda coorientou. A pesquisa objetivou verificar qual o melhor número de aplicações da TFBM a laser para o aumento da viabilidade de retalhos cutâneos. Até o presente momento pode ser concluído que o número de aplicação da TFBM a laser interfere na viabilidade do RC, sendo que o melhor número de aplicações para a diminuição do tecido necrótico foram duas aplicações imediatamente após a confecção do retalho.

Constatou-se que em pesquisas mais recentes tem havido um predomínio de confecção de retalho de base caudal, diferentemente do utilizado nessa pesquisa. Portanto, acredita-se que em pesquisas futuras a utilização desse modelo experimental será o mais adequado

Além disso a realização dessa pesquisa motiva novos questionamento para futuras pesquisas visando elucidar as respostas teciduais causadas pela aplicação exclusiva do tratamento preemptivo, ou sua associação com um número menor de aplicações da TFBM uma vez que, os resultados parciais de dados ainda em análise indicam que há uma resposta energética cumulativa da irradiação, mostrando-se mais eficiente um número reduzido de aplicações da TFBM.

Lasers in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2694-3>

ORIGINAL ARTICLE



Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats

Cintia Cristina Santi Martignago¹ · C. R. Tim^{2,3} · L. Assis^{2,3} · L. M. G. Neves¹ · P. S. Bossini⁴ · A. C. Renno² · L. R. S. Avo¹ · R. E. Liebano¹ · N. A. Parizotto^{1,3}

Received: 11 September 2018 / Accepted: 22 November 2018
 © Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2018

Abstract

To identify the best low level laser photobiomodulation application site at the same irradiation time to increase the viability of the skin flap in rats. Eighteen male rats (*Rattus norvegicus*, var. Albinus, Rodentia Mammalia) were randomly distributed into three groups ($n = 6$). Group I (GI) was submitted to simulated laser photobiomodulation; group II (GII) was submitted to laser photobiomodulation at three points in the flap cranial base, and group III (GIII) was submitted to laser photobiomodulation at 12 points distributed along the flap. All groups were irradiated with an Indium, Gallium, Aluminum, and Phosphorus diode laser (InGaAlP), 660 nm, with 50 mW power, irradiated for a total time of 240 s in continuous emission mode. The treatment started immediately after performing the cranial base random skin flap (10×4 cm² dimension) and reapplied every 24 h, with a total of five applications. The animals were euthanized after the evaluation of the percentage of necrosis area, and the material was collected for histological analysis on the seventh postoperative day. GIII animals presented a statistically significant decrease for the necrosis area when compared to the other groups, and a statistically significant increase in the quantification of collagen when compared to the control. We did not observe a statistical difference between the TGF β and FGF expression in the different groups evaluated. The application of laser photobiomodulation at three points of the flap cranial base was more effective than at 12 points regarding the reduction of necrosis area.

Keywords Skin flap · Tissue viability · Laser photobiomodulation · Collagen · Transforming growth factor beta and fibroblast growth factor

Introduction

The skin flap is a technique widely used in plastic surgery to reconstruct skin and soft tissue defects [1]. However, it presents some complications that include tissue ischemia [2], which can vary between 2 and 20% of cases [3] depending on the area in which the flap is performed. This fact is of great concern because it may require secondary surgical

interventions, lead to infections, and delay treatment. Considering the complexity of this complication and the changes that it can cause in the patients' quality of life, treatments that favor tissue vascularization have been increasingly researched. In this perspective, studies focused on low-level laser therapy or photobiomodulation (PBM) [4–7], which acts in several phases of the wound healing process including cell differentiation and proliferation, neovascularization, stimulation of collagen synthesis, and reepithelialization [8].

The increase in the number of blood vessels and release of nitric oxide are believed to be responsible for reducing the amount of necrotic tissue [9–11]. In addition, it is also known that tissues with higher concentration of collagen have greater tensile strength; characteristics are important for the quality of the tissue [12].

Transforming growth factor beta (TGF β) and fibroblast growth factor (FGF) are families of proteins closely linked to both vascular neof ormation and modulation of collagen synthesis [13]. TGF β participates as an extracellular matrix

✉ Cintia Cristina Santi Martignago
 csantimartignago@yahoo.com.br

¹ Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

² Federal University of São Paulo, Santos, SP, Brazil

³ Biomedical Engineering, University Brasil, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Researcher of the Nucleus of Research and Teaching of Phototherapy in Health Sciences, São Carlos, SP, Brazil

ANEXO II

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRATAMENTO PREEMPTIVO COM TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (660 nm) NA VIABILIDADE DE RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 6224290515, sob a responsabilidade de **Cintia Cristina Santi Martignago** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 15/07/2015.

We certify that the proposal "ANALYSIS THE EFFECTS OF PREEMPTIVE TREATMENT WITH LOW LEVEL LASER THERAPY (660 nm) ON VIABILITY SKIN FLAPS IN RATS", utilizing 147 Isogenic rats (147 males), protocol number CEUA 6224290515, under the responsibility of **Cintia Cristina Santi Martignago** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/15/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 02/2015 Área: [Fisioterapia](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [147](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [260 a 300 g](#)

Resumo: O retalho cutâneo é uma técnica da cirurgia plástica utilizada frequentemente, que apresenta como principal complicação a isquemia do tecido, podendo levar a necrose do retalho. O tratamento preemptivo vem sendo estudado visando à prevenção primária de diversas complicações, dentre elas a da necrose de retalhos cutâneos. Tratamentos preemptivos com medicamentos demonstraram resultado favorável na viabilidade dos retalhos cutâneos. Pesquisas in vitro têm demonstrado que a terapia laser de baixa intensidade (LLLT) age positivamente fotobiomodulando importantes eventos que atuam nos processos inflamatório, na angiogênese e na formação da matriz extracelular, sugerindo que a irradiação no período pré-operatório pode interferir nos processos acima citados aumentando a viabilidade dos retalhos cutâneos. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos do tratamento preemptivo com laser de baixa intensidade (660 nm) com diferentes fluências na viabilidade em retalhos cutâneos em ratos. Para isso será realizado um experimento in vivo utilizando 147 ratos, da linhagem Wistar, distribuídos em 8 grupos. O grupo 1 submetido à simulação de tratamento de LLLT com o aparelho desligado iniciando-o 48 horas pré-operatório, o grupo 2 será submetido à irradiação com LLLT iniciando 48 horas pré-operatório com uma fluência de 1 J/cm², o grupo 3 será submetido à irradiação com LLLT iniciando 48 horas pré-operatório com uma fluência de 3 J/cm², o grupo 4 será submetido à irradiação com LLLT iniciando 48 horas pré-operatório com uma fluência de 6 J/cm², o grupo 5 será submetido à simulação ao tratamento a LLLT com o aparelho desligado iniciando-o imediatamente após o procedimento operatório, o grupo 6 iniciará o tratamento com LLLT imediatamente após a operação com uma fluência de 1 J/cm², o grupo 7 iniciará o tratamento com LLLT imediatamente após a operação com uma fluência de 3 J/cm² e o grupo 8 iniciará o tratamento com LLLT imediatamente após a operação com uma fluência de 6 J/cm². Todos os grupos experimentais receberão 4 aplicações de LLLT, respeitando o intervalo de 24 horas entre as aplicações, sendo elas aplicadas em um único ponto a 2,5 cm da base do crânio. O retalho cutâneo randômico de base cranial será realizado com dimensões de 10 X 4 cm e uma barreira plástica será interposta entre o mesmo e o leito doador. Os animais serão sacrificados em 3 períodos experimentais distintos; no momento da realização do retalho, no quarto e no sétimo dia após a cirurgia. Nesses três momentos será avaliada a expressão gênica (VEGF; VEGFR 2; FGF; TNF γ ; TGF β e IL8); expressão proteica (imunohistoquímica) e análise histológica (contagem de vasos sanguíneos e mastócitos). Outro dado a ser analisado será a área da necrose, sendo ela avaliada apenas no quarto e sétimo dia após o procedimento operatório com o método do gabarito e papel. Para a análise estatística, será realizada o teste de normalidade de Shapiro Wilk e análise de variância será ANOVA- Three way. Na presença de diferença significativa (p<0,05) será aplicado o teste de post-hoc Tukey.

Local do experimento: Laboratório de Recursos terapêuticos

São Carlos, 10 de agosto de 2018

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Geoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO III

- Fwd: Successfully received: submission Preemptive treatment with photobiomodulation therapy in skin flap viability. for Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 2 Yahoo/Enviados ★



● **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology** <EvisSupport@elsevier.com>

Para: csantimartignago@yahoo.com.br



11 de mar às 20:14 ★

This message was sent automatically.

Ref: JPHOTOBIOLOG_2019_296

Title: Preemptive treatment with photobiomodulation therapy in skin flap viability.

Journal: Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

Dear Dr. Santi,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=JPHOTOBIOLOG and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

Have questions or need assistance?


For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO IV

DMC IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE EQUIPAMENTOS LTDA



Relatório de amostras

Identificador do relatório: MESP002

Dados gerais

Nº de ordem: 05 27294 P602	Item: 6-FOR-772 (3) - Placa de Teste do Photon Laser II - AT	Revisão: 3	Data de início: 26/07/2016
Processo: CONTROLE DE QUALIDADE		Atividade: CONTROLE DE QUALIDADE	

Características

Variável											
Identificador	Nome	LI	Valor nominal	LSI	Méda	Amplitude	Desvio padrão	Cp	Cpk	Pp	Ppk
Teste 1	Verificar potência laser vermelho - modo normal, contínuo e 300,0cm2 (Ver 6-INS-45)	80.00	100.00	120.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Amostra 1		Lectura 1	Data de início	Hora	Méda	Amplitude	Desvio padrão				
		100.00	26/07/2016	09:55	100.00	0.00	0.00				

Identificador	Nome	LI	Valor nominal	LSI	Méda	Amplitude	Desvio padrão	Cp	Cpk	Pp	Ppk
Teste 2	Verificar potência laser infravermelho - modo normal, contínuo e 300,0cm2 (Ver 6-INS-45)	80.00	100.00	120.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Amostra 1		Lectura 1	Data de início	Hora	Méda	Amplitude	Desvio padrão				
		100.00	26/07/2016	09:55	100.00	0.00	0.00				

Atributo

Página 1 de 3

Gerado por Vinícius Gomes Seregani (19143)

26/07/2016 - 11:36

Atributo											
Identificador	Nome	p	np	c	u						
Teste 3	Verificar modo pulsado - 10PPS - laser vermelho (Ver 6-INS-45)	0.00	0.00	0.00	0.00						
Amostra 1		Data	Hora	Qtd. itens	Qtd. itens defeituosos	Qtd. itens rejeitados	p	np	c	u	
		26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificador	Nome	p	np	c	u						
Teste 4	Verificar modo pulsado - 10PPS - laser infravermelho (Ver 6-INS-45)	0.00	0.00	0.00	0.00						
Amostra 1		Data	Hora	Qtd. itens	Qtd. itens defeituosos	Qtd. itens rejeitados	p	np	c	u	
		26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificador	Nome	p	np	c	u						
Teste 5	Verificar o funcionamento do pedal (Ver 6-INS-45)	0.00	0.00	0.00	0.00						
Amostra 1		Data	Hora	Qtd. itens	Qtd. itens defeituosos	Qtd. itens rejeitados	p	np	c	u	
		26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificador	Nome	p	np	c	u						
Teste 6	Verificar se o equipamento emite sinal sonoro a cada 10 segundos (Ver 6-INS-45)	0.00	0.00	0.00	0.00						
Amostra 1		Data	Hora	Qtd. itens	Qtd. itens defeituosos	Qtd. itens rejeitados	p	np	c	u	
		26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Página 2 de 3

Gerado por Vinícius Gomes Seregani (19143)

26/07/2016 - 11:36

		Atributo			
Identificador	Nome	p	np	c	u
Teste 7	Embalagem e Rotulagem (Ver 15-PROC-20)	0.00	0.00	0.00	0.00
Identificador	Data	Hora	Qtd. Itens	Qtd. Itens defeituosos	Qtd. Itens rejeitados
Amostra 1	26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00
Identificador	Nome	p	np	c	u
Teste 8	Check List (Ver 15-PROC-20)	0.00	0.00	0.00	0.00
Identificador	Data	Hora	Qtd. Itens	Qtd. Itens defeituosos	Qtd. Itens rejeitados
Amostra 1	26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00
Identificador	Nome	p	np	c	u
Teste 9	Atributos e Peças Substituídas	0.00	0.00	0.00	0.00
Identificador	Data	Hora	Qtd. Itens	Qtd. Itens defeituosos	Qtd. Itens rejeitados
Amostra 1	26/07/2016	09:55	1.00	0.00	0.00