

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

**“LASER VERMELHO E INFRAVERMELHO EM
DIFERENTES FLUÊNCIAS NA VIABILIDADE DO RETALHO
CUTÂNEO RANDÔMICO EM RATOS”**

VIVIAN CURY

SÃO CARLOS – SP

2010

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

**“LASER VERMELHO E INFRAVERMELHO EM
DIFERENTES FLUÊNCIAS NA VIABILIDADE DO RETALHO
CUTÂNEO RANDÔMICO EM RATOS”**

Aluna: Vivian Cury

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do programa de Pós-
Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos –
PPG/ UFSCar como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Fisioterapia

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti

Apoio financeiro: CNPq

SÃO CARLOS – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C982ls

Cury, Vivian.

Laser vermelho e infravermelho em diferentes fluências na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos / Vivian Cury. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Lasers. 2. Retalho cutâneo. 3. Laserterapia. 4. Neovascularização. 5. HIF-1alpha. I. Título.

CDD: 615.83 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE Vivian Cury APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE MARÇO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



**Nivaldo Antonio Parizotto
(UFSCar)**



**Carlos Eduardo Pinfildi
(UNIFESP)**



**Richard Eloin Liebano
(UNICID)**

Dedicatória

Dedico este trabalho.....

..... ao meu pai Renato, exemplo de honestidade, humildade e dedicação a família. Meu herói.

..... à minha querida e amada mãe Tânia (in memoriam), por toda sua garra e amor a vida e a família.

..... ao Marcelo, meu companheiro de todas as horas, por me dar força, apoio e amor.

..... à minha irmã Mirian, pelo apoio, paciência, risadas e amor.

Amo muito todos vocês

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Com carinho ao orientador **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto** pela oportunidade a mim dada, pelos ensinamentos, confiança, benevolência e amizade, que possibilitaram o meu crescimento profissional. Mais uma etapa da minha vida se concretiza. O mestrado era um sonho durante a graduação e se tornou realidade, graças às ótimas pessoas que sempre tive ao meu lado e que me deram força, iluminando meu caminho e me indicando a direção.

Ao Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues e seu pupilo Wagner Luis Reis da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, pelas instruções, paciência, por terem me disponibilizado o laboratório e por toda ajuda na análise de Nitrito/Nitrato, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Carlos Benatti Neto e ao técnico em histologia José Antônio Zuanon da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, pela ajuda no processamento histológico. Obrigado pelos conselhos pela amizade, e por toda contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, por me receber em seu laboratório e contribuir nas análises fundamentais dessa dissertação.

À Prof. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo, pelo carinho, disponibilidade, amizade, paciência e por seus preciosos ensinamentos.

À Prof. Dra. Tânia de Fátima Salvini da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por permitir o uso dos equipamentos de microscopia de seu laboratório.

AGRADECIMENTOS

À DEUS

Ao meu querido e amado pai, que possibilitou esta caminhada me guiando, apoiando, ensinando, com todo afeto e sabedoria. TE AMO.

À minha amada mãe, por todo amor dedicado a família, mesmo doente nunca deixou transparecer suas angustia e dor, para nos tranqüilizar e tornar nossa caminhada mais doce. Exemplo de mulher e mãe. TE AMO

À minha irmã, pelos momentos vividos, por agüentar minhas queixas e participar de minhas vitórias. TE AMO

Ao meu companheiro Marcelo, por tudo que representa na minha vida. TE AMO

Aos meus familiares, principalmente meus avós Cidoca, Zeca, Igneis, pelas orações, abençoes, amor, ensinamentos, amo vocês.

Às amigas que conquistei no laboratório e vou levar pra toda vida, Lívia R. Assis, Davilene Gigo Benato e Carla Tim, obrigada pela ajuda cedida neste trabalho, pelas risadas e momentos de divertimento.

Ao amigo Paulo Bossini pela força, incentivo, companheirismo durante todos esses anos de convivência, ajuda e sugestões na elaboração dessa dissertação.

À amiga Jaqueline S. Crusca, por toda ajuda essencial concedida durante os experimentos.

Meus amigos e colegas de laboratório, Charles, Thiago, Elaine, Poliane, Emiliano, Renan, Natália, pela ajuda, estima, por todos os bons momentos compartilhados e confiança em mim depositada.

Às alunas de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFSCar, Daniele Coatrini e Elisa D. Pires, pelo auxílio no nosso trabalho.

À amiga Patrícia Bueno pelo incentivo, carinho, amizade, conversas, ensinamento e pelos ótimos momentos passados juntas.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício, Guilherme, Gilberto (Juca), Márcia, pelo apoio e carinho durante esse período da minha vida.

Às meninas da secretaria da pós-graduação da fisioterapia, Kelly e Cris.

Aos amigos Diego, Isadora e Dóris, com quem morei durante um ano em São Carlos, pela amizade e auto-ajuda.

Ao tio Ricardo e Simone, pelo incentivo e pelos galhos quebrados em São Carlos.

À todos os meus amigos de Torrinha e alguns de São Paulo, Lelê, Josy, Leonardo, Luna, Rodrigo, Eduardo, Érica, Maria Odila, Marcela, Maria Cândida, família Balanceis, Bruno (Gardenal), Tiago, Katia, Carlos, Simone, Wagner e a todos com quem dividi uma cerveja no final de semana.

Muito Obrigada a todos que fizeram parte da minha caminhada, e a todos que contribuíram para realização desse trabalho.

“O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do que os outros fizeram de nós”

Jean Paul Sartre

RESUMO

Os retalhos cutâneos são amplamente utilizados na cirurgia plástica, principalmente na reconstrutiva. Após o procedimento operatório, uma das principais complicações é a isquemia, podendo ocasionar a necrose do retalho. Vários recursos têm sido estudados com o intuito de aumentar a viabilidade desses retalhos. Dentre esses recursos, o *laser* de baixa intensidade é uma alternativa de tratamento, uma vez que pode promover um aumento da microcirculação e da neoformação vascular. Entretanto, existem discrepâncias na literatura em relação aos parâmetros empregados no uso do *laser* de baixa intensidade, principalmente das fluências utilizadas nos tratamentos. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de 2 comprimentos de onda diferentes (660nm e 780nm), com fluências de 30 e 40J/cm², na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos, avaliados pelo método do gabarito de papel, contagem dos vasos sanguíneos, atividade da metaloproteínase de matriz -2 (MMP-2), avaliação dos níveis plasmáticos de NO, e expressão do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α). Sessenta ratos da linhagem *Wistar* foram usados nesse estudo, sendo distribuídos em 5 grupos (n=12): grupo controle, grupo irradiado com 660nm a 30J/cm²; grupo irradiado com 660nm a 40J/cm², grupo irradiado com 780nm a 30J/cm², e grupo irradiado com 780nm a 40J/cm². O retalho cutâneo foi realizado no dorso dos animais com dimensões de 10 X 4cm e uma barreira plástica foi interposta entre o retalho e o leito doador. Os animais receberam irradiação laser imediatamente após a cirurgia e nos 4 dias seguintes, utilizando-se a técnica pontual em contato em 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho. No sétimo dia pós-operatório foi avaliado a porcentagem de área de necrose e coletado amostras de tecido para análise histológica, zimografica e de expressão protéica por western blotting, os animais foram eutanaziados por exsanguinação, e no sangue foram avaliados os níveis plasmáticos de NO. Os dados obtidos a partir da avaliação pelo método de gabarito de papel mostraram que não houve aumento na viabilidade dos retalhos cutâneos após tratamento com laser. Pelas análises bioquímicas observamos que o laser modulou a atividade de MMP-2 e a expressão de HIF-1 α , bem como induziu o aumento no número de vasos especialmente nos grupos irradiados com 40J/cm² independente do comprimento de onda utilizado. A medida do NO circulante não apresentou diferença entre os grupos. A análise molecular mostrou que a aplicação do laser com os parâmetros aqui utilizados, embora tenha estimulado a angiogênese por modular HIF-1 α e a atividade de MMP-2 não foi capaz de melhorar a viabilidade dos retalhos cutâneos. Assim, concluímos que para encontrarmos os efeitos benéficos e seguros da laserterapia precisamos compreender seus mecanismos de ação e conhecer os melhores parâmetros de utilização.

Palavras-chave: LLLT, terapia a laser de baixa intensidade, neovascularização, retalhos cirúrgicos.

ABSTRACT

Skin flaps are widely used in plastic surgery, mainly in reconstruction surgeries (transference of skin graft, pre-made tissues). After the surgery one of the major complication is ischemia, which may cause necrosis of the flap. Several features have been studied with the aim of increasing the viability flaps. Among these features, the low laser therapy is an alternative treatment, since it can promote an increase in microcirculation and vascular neof ormation. However, there are discrepancies in the literature of the parameters employed in the use of laser, especially the fluence used in treatment . The aim of this study was to investigate the effects of 2 different laser wavelengths (660nm e 780nm) at 30 and 40J/cm², on the viability of skin flap in rats evaluated by the paper template, vessels blood counting, activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), evaluation of plasma levels of NO, and expression hypoxia-inducible Factor 1 α . Sixty male animals *Wistar* were used in this study and they were distributed into the following groups (n=12 each group): control group, group irradiated with 660nm, at 30J/cm²; group irradiated with 660nm, at 40J/cm² group irradiated with 780nm, at 30J/cm², and group irradiated with 780nm, at 40J/cm². The skin flap was performed on the back of all animals studied, with a plastic sheet interposed between the flap and the donor site. The animals received laser irradiation immediately after surgery and within 4 days, using the technical point of contact, on 24 points on the skin surface and around it. On the seventh postoperative day was evaluated the percentage of necrotic area and collected samples of tissue for histological analysis, zymography and protein expression by Western blotting, animals were euthanized by exsanguination, and blood were evaluated plasma levels of NO. The data obtained from the evaluation by the method of the paper template showed no increase in the viability of skin flaps after laser treatment. For biochemical analysis we found that the laser modulates the activity of MMP-2 and expression of HIF-1 α and induced an increase in the number of vessels especially in the groups irradiated with 40J/cm² Measurement plasma level of NO did not differ between groups. Molecular analysis showed that the application of laser parameters used here, although it stimulated angiogenesis by modulating HIF-1 α and activity of MMP-2 was not able to improve the viability of skin flaps. Thus, we conclude that to find the beneficial effects of laser therapy we need to understand their mechanisms of action and know the best parameters to use.

Keywords: Laser therapy, low-level; neovascularization; surgical flaps.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARNT	Aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator
ASGaAL	Arseneto de Gálio e Alumínio
ATP	Trifosfato de adenosina
CL	Grupo Controle
Cm	Centímetro
cm²	Centímetro ao quadrado
°C	Graus Celsius
cGMP	Guanosina monofosfato ciclica
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
eNOS	Óxido Nitrico Sintase Endotelial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGFb	Fator de crescimento de fibroblasto básico
HIF-1	Fato induzível por hipóxia
HE	Hematoxilina e eosina
IV 30	Grupo irradiado com laser infravermelho (780nm) 30 J/cm ²
IV 40	Grupo irradiado com laser infravermelho (780nm) 40 J/cm ²
IGF	Fator de crescimento tipo-insulina
J	Joule
J/cm²	Joule por centímetro ao quadrado
kDa	Kilodalton
Laser	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LLLT	Terapia <i>laser</i> de baixa intensidade
MDA	Malondialdeído
mg/kg	Miligrama por quilograma de massa corporal
Mm	Milímetro
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
mW	MiliWatts
N	Número da amostra
NaNO₃	Nitrato de sódio
Nm	Nanômetro
NO₂⁻	Dióxido de nitrogênio
NO	Óxido Nitrico
O₂	Oxigênio
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
SOD	Superóxido-dismutase
TGF-β	Fator de crescimento transformador
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
V 30	Grupo irradiado com laser vermelho (660nm), 30 J/cm ²
V 40	Grupo irradiado com laser vermelho (660nm), 40 J/cm ²

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
<	Menor
*	Significativo
λ	Comprimento de onda
μm	Micrometro
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Parte I

Figura 1. Equipamento emissor da radiação <i>laser</i> (MM Optics Ltda [®])	23
Figura 2. Esquema ilustrativo da demarcação dos pontos de aplicação da radiação.....	24
Figura 3. Retalho planejado (10 x 4cm).....	25
Figura 4. Retalho cutâneo randômico de base cranial elevado	26
Figura 5. Posicionamento da barreira plástica entre o retalho e o leito doador	26
Figura 6. Retalho suturado após interposição da barreira plástica	27
Figura 7. Técnica de aplicação pontual em contato utilizando molde.....	28
Figura 8. Visualização da área a ser demarcada por meio do papel vegetal.....	29
Figura 9. Retalho com delimitação entre área necrosada e a área viável estandardizada.....	29
Figura 10. Representação da amostra do retalho cutâneo coletado para estudo	30
Figura 11. Representação da subdivisão do retalho cutâneo e sua disposição nas laminas..	32

Parte II

Artigo 2

Figura 1. Gráfico referente à quantificação de capilares sanguíneos	54
Figura 2. Gráfico referente à atividade da MMP-2.....	55
Figura 3. Gráfico referente à concentração de Oxido Nítrico plasmático	56
Figura 4. Gráfico referente à Expressão de HIF - 1 α	57

LISTA DE TABELAS

Parte II

Artigo I

Tabela 1. Dados descritivos da porcentagem de necrose dos retalhos nos diferentes grupos estudados	41
---	----

Artigo II

Tabela 1. Dados descritivos da contagem de vasos sanguíneos por grupo	53
--	----

Esta dissertação foi estruturada no modo de artigos, sendo dividida em 3 partes, redigida com base nas normas metodológicas da *ABNT*.

A primeira parte é constituída de um resumo, justificativa, objetivo e detalhamento da metodologia empregada.

A segunda parte compreende os artigos elaborados com base na primeira parte. Foram redigidos dois artigos, o primeiro abordando a avaliação do retalho cutâneo pelo método do gabarito de papel, denominado: “The Effects Of The 660nm and 780nm Laser Irradiation On Viability Of Random Skin Flap In Rats” (Efeitos da irradiação laser 660nm e 780nm na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos), publicado pela **Photomedicine and Laser Surgery** em outubro de 2009. O segundo artigo aborda os aspectos relacionados com a vascularização do retalho cutâneo sob ação do laser, intitulado: “Efeitos da Irradiação Laser na Viabilidade do Retalho Cutâneo Randômicos de Ratos: Modulação da Atividade de MMP-2, da expressão de HIF-1 α durante a angiogênese.

A terceira parte é composta das conclusões gerais obtidas a partir dos resultados experimentais, bibliografia utilizada e anexo.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
SUMÁRIO.....	15

PARTE I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivo específico	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais de Experimentação.....	22
3.2 Equipamento Emissor da Radiação Laser.....	22
3.3 Delineamento Experimental	23
3.4 Técnica Cirúrgica.....	25
3.5 Método de determinação de porcentagem da área de necrose dos retalho.....	28
3.6 Coleta da Amostra do Retalho Cutâneo	30
3.7 Eutanásia dos animais e coleta de sangue	31
3.8 Procedimento morfológico	31
3.9 Contagem dos vasos sanguíneos.....	32
3.10 Determinação da atividade de MMPs por zimografia.....	33
3.11 Determinação indireta do NO pela dosagem de Nitrato	33
3.11.1 Dosagem de proteínas do plasma.....	34
3.12 Expressão de HIF-1 α por Western Blotting	34
3.13 Análise Estatística	35

PARTE II

Artigo I: The Effects Of The 660nm And 780nm Laser Irradiation On Viability Of Random Skin Flap In Rats	37
---	----

Artigo II: Efeitos da Irradiação Laser na Viabilidade do Retalho Cutâneo Randômico de Ratos: Modulação da Atividade de MMP-2 e da Expressão de HIF-1 α Durante a Angiogênese	47
---	----

PARTE III.....

4. CONCLUSÕES FINAIS.....	69
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
6. ANEXO	77

PARTE I

Introdução

Objetivo

Metodologia

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A utilização de retalhos cutâneos é um recurso muito freqüente em cirurgia plástica e reparadora (CYMROT, PERCÁRIO, FERREIRA, 2004), representando às vezes a única oportunidade para o reparo cirúrgico após a ressecção de lesões de pele, tumores ou quando é necessária reconstituição de uma extensa área de pele. Embora a utilização de retalho cutâneos em cirurgias seja um procedimento frequente e seguro, pode ocorrer complicações, sendo a necrose a mais temida (BIONDO-SIMÕES, *et al.*, 2000).

Parte do dano tecidual no retalho cutâneo randômico, se deve ao fluxo sanguíneo inadequado, levando a necrose isquêmica (CYMROT, PERCÁRIO, FERREIRA, 2004; JUNIOR, *et al.*, 2004), resultando às vezes na perda do retalho (KERRIGAN, 1983; BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000).

Para garantir o suprimento sanguíneo adequado do retalho é necessário que ocorra angiogênese. A angiogênese é o processo de formação de capilares a partir de vasos pré-existentes (BOTUSAN, *et al.*, 2008). Ela envolve múltiplos passos como, migração e invasão de células endoteliais, formação do lúmen, conexão de novos segmentos vasculares com a circulação preexistentes, e remodelação da matriz extracelular (MEC), no qual as metaloproteinases (MMPs) são extremamente importantes (CONWAY, COLLEN, CARMELIET, 2001).

Os eventos celulares que ocorrem durante a angiogênese são complexos e altamente regulados por diferentes vias de sinalização. Sabe-se que muitos desses eventos dependem de mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica (HAMIK *et al.*, 2006). A expressão dos fatores de crescimento angiogênicos dependem da atividade de fatores de

transcrição como o Fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), fatores de transcrição da família Hey1/2.

No modelo proposto, a perda do retalho por necrose é geralmente causada por hipóxia, razão pela qual tivemos especial interesse em investigar o fator de transcrição HIF-1 α . O fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) foi inicialmente descrito como um fator heterodimérico nuclear composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT). HIF-1 β é constitutivamente expresso na maioria das células, já o HIF-1 α é induzido em presença de baixas concentrações de oxigênio celular (MILKIEWICZ e HAAS, 2005).

Em normoxia, a regulação da atividade do complexo HIF-1 é dependente da degradação da subunidade HIF-1 α pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Células em hipóxia podem sofrer estabilização e acúmulo da proteína HIF-1 α , principalmente através da inibição de sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (MILKIEWICZ e HAAS, 2005). O HIF-1 α tem um papel fundamental na cicatrização de feridas, ele é necessário para a expressão não só de fatores de crescimento angiogênicos, mas também para motilidade celular e recrutamento de células progenitoras endoteliais (BOTUSAN *et al.*, 2008).

Descreve-se que o primeiro passo para o crescimento de capilares é a ativação da célula endotelial, que inicia a proteólise da membrana basal, proliferação celular e o subsequente crescimento de um novo capilar (RIVILIS *et al.*, 2002). Tanto a proliferação celular quanto a degradação da membrana basal são essenciais para a angiogênese. A proliferação celular é mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente agente mitogênico cuja expressão é induzida por HIF-1 (FANG *et al.* 2001; RIVILIS *et al.* 2002; ALBINA *et al.*, 2001). Quanto à degradação da membrana basal, esta é mediada principalmente por enzimas proteolíticas da família das Metaloproteinases (MMPs). As MMPs são uma família de enzimas que regulam os eventos fisiológicos relacionados ao

desenvolvimento, regulando processos como morfogênese, cicatrização de feridas, invasão e crescimento tumoral (VU e WERB, 2000). Durante a angiogênese as MMPs facilitam a migração celular e são necessárias para liberarem fatores pro-angiogênicos aprisionados na MEC, as MMPs podem processar e ativar fatores de crescimento e receptores, incluindo integrinas e receptores de adesão celular (RUNDHAUG, 2005). O papel das MMPs na angiogênese é complexo, estas enzimas podem facilitar ou inibir o processo de angiogênese.

Pelo exposto acima, vimos que existe uma relação entre a viabilidade do retalho e o processo de angiogênese. Dessa maneira, controlar este processo seria uma importante estratégia terapêutica no auxílio da viabilidade dos retalhos, melhorando seu aporte sanguíneo. Com o intuito de garantir a viabilidade dos retalhos, são usados vários tipos de drogas com ação vasodilatadora, anticoagulante, antioxidante, inibitória sobre as prostaglandinas, bloqueadoras de canais de cálcio e antiadrenérgicas (JURELL e JONSOON, 1976; DUARTE *et al.*, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; LIEBANO *et al.*, 2002). Muitas dessas drogas exercem efeitos benéficos sobre o retalho, porém algumas delas podem levar a efeitos sistêmicos indesejáveis.

Desse modo, vários pesquisadores têm investigado a ação de recursos não-farmacológicos, como a acupuntura e a eletroacupuntura (NIINA *et al.*, 1997), correntes elétricas de baixa frequência polarizadas (IM, LEE, HOOPES, 1990) ou não polarizadas (KJARTANSSON e LUNDEBERG, 1990; NIINA, *et al.*, 1997; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002) e o laser de baixa intensidade (KAMI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992; KUBOTA e OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000) com o objetivo de melhorar a viabilidade tecidual e minimizar a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis.

A laserterapia de baixa intensidade tem sido amplamente utilizada para acelerar o processo de cicatrização (SCHINDL *et al.*, 1998; ORTIZ *et al.*, 2001). Os resultados

mostraram que o laser pode aumentar a microcirculação e a angiogênese, proliferação de fibroblastos, a deposição de colágeno e aumentar o metabolismo celular após a sua aplicação (KAMI *et al.*, 1985, SMITH *et al.* 1992; KUBOTA, OSHIRO, 1996; AMIR *et al.*, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001). Alguns autores têm mostrado um aumento do aporte sanguíneo e uma conseqüente melhora na sobrevida de retalhos cutâneos após irradiação com laser (AMIR *et al.*, 2000; KUBOTA, 2002, PINFILDI *et al.*, 2005, BOSSINI *et al.*, 2009). Kubota e Ohshiro (1996) também atribuem o aumento da viabilidade à melhor perfusão sanguínea.

Os resultados da laserterapia são discrepantes principalmente porque há uma discordância com relação aos parâmetros utilizados. A interação do laser com o tecido produz diferentes efeitos, dependendo da energia aplicada (LUNDEBERG e MALM, 1991). Dessa maneira, para avaliar sua eficácia no tratamento dos retalhos cutâneos em ratos, são necessários trabalhos que investiguem - não só a aplicação do laser de baixa intensidade (como o de diodo) em diferentes dosimetrias, mas também aqueles que analisem os mecanismos moleculares envolvidos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos gerais:

Investigar os efeitos da aplicação do laser de baixa intensidade em dois comprimentos de onda, 660nm (vermelho) e 780nm (infravermelho), em retalhos cutâneos;

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Avaliar os efeitos da aplicação de diferentes fluências, $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$, dos lasers vermelho e infravermelho sobre a qualidade do retalho cutâneo, analisando a quantidade de tecido viável entre os grupos;

2.2.2. Avaliar alterações morfológicas provocadas pela aplicação de diferentes fluências, $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$, dos lasers vermelho e infravermelho nos retalhos cutâneos;

2.2.3. Avaliar a atividade proteolítica da MMP-2 nos retalhos cutâneos após aplicação de diferentes fluências, $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$, dos lasers vermelho e infravermelho;

2.2.4. Avaliar a concentração de óxido nítrico plasmático após a aplicação de diferentes fluências, $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$, dos lasers vermelho e infravermelho sobre o retalho cutâneo;

2.2.5. Analisar a expressão protéica do HIF-1 α nos retalhos cutâneos após a aplicação de diferentes fluências, $30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$, dos lasers vermelho e infravermelho;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*) machos, da linhagem Wistar, com três meses de idade e massa corporal variando de 260 a 320 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de São Carlos.

Os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar durante todo o procedimento experimental em gaiolas apropriadas de prolipropileno padrão, individual, em temperatura ambiente entre 22 e 24°C, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado e ventilação adequada, recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996), e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar CEEA/UFSCar (parecer 10/2008, anexo 1).

3.2 Equipamento Emissor da Radiação Laser

Utilizou-se um aparelho laser de baixa intensidade de diodo AsGaAl (Arseneto de Gálio e Alumínio), da marca MMO (MM Optics Ltda[®]), modelo Twin Laser, classe 3B, com comprimento de onda de 660nm e 780nm, potência de saída de 40mW, área do feixe de 0,04cm² e em modo contínuo (Figura 1).

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

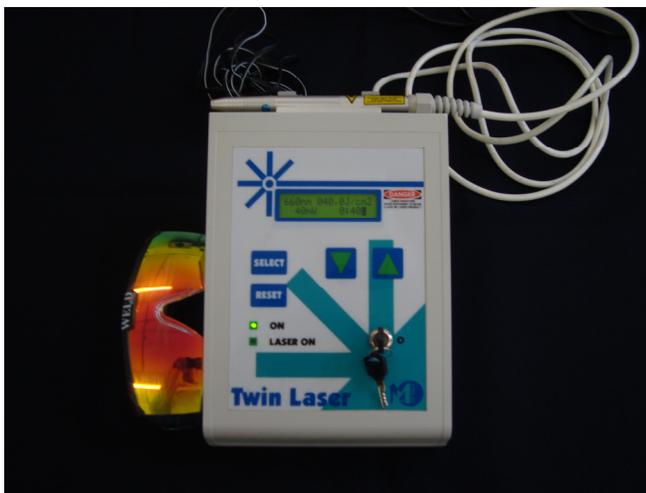


Figura 1- Equipamento emissor da radiação *laser* (MM Optics Ltda[®])

3.3 Delineamento Experimental

Os 60 ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente, em 5 grupos de 12 animais (CL, V30, V40, IV30, IV40) para a realização dos retalhos cutâneos randômicos.

Grupo CL – os animais deste grupo foram submetidos à cirurgia e à simulação da radiação laser em 24 pontos, por 40 segundos por ponto.

Grupo V30 – os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 660\text{nm}$) com fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$, por 30 segundos, fornecendo $1,2\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, num total de $28,8\text{J}$ de energia total depositada.

Grupo V40 – os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 660\text{nm}$), com fluência de $40\text{J}/\text{cm}^2$, por 40 segundos, fornecendo $1,6\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, num total de $38,4\text{J}$ de energia total depositada.

Grupo IV30 – os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 780\text{nm}$), com fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$, por 30 segundos, fornecendo $1,2\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, num total de $28,8\text{J}$ de energia total depositada.

Grupo IV40 os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 780\text{nm}$), com fluência de $40\text{J}/\text{cm}^2$, por 40 segundos, fornecendo $1,6\text{J}$ de energia por ponto, em 24 pontos, num total de $38,4\text{J}$ de energia total depositada.

Todos os grupos receberam a radiação laser imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subsequentes à lesão. Em todos os grupos a aplicação foi feita em 24 pontos, distribuídos sobre e ao redor do retalho cutâneo de base cranial, em uma única aplicação ao dia. Estes pontos de radiação foram dispostos a 1cm da margem do retalho e a 2cm entre si (Figura 2).

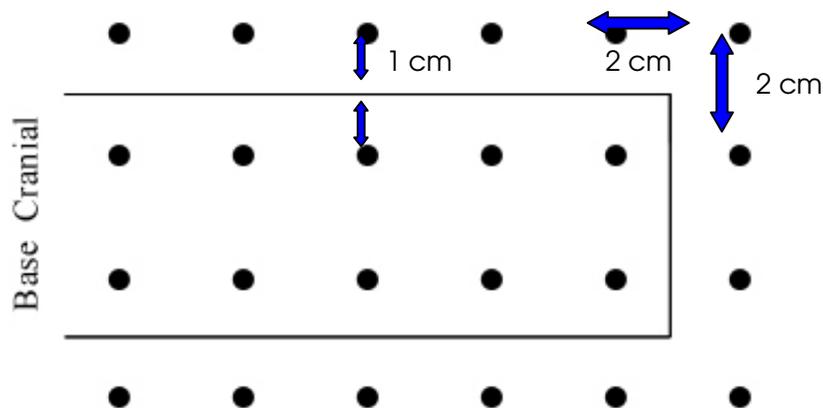


Figura 2 – Esquema ilustrativo da demarcação dos pontos de aplicação da radiação laser com distância de 2cm entre os pontos e de 1cm da margem do retalho (BOSSINI, 2009).

3.4 Técnica Cirúrgica

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

Na seqüência, o retalho cutâneo randômico de base cranial, com dimensões de 10 cm de comprimento e 4cm de largura, foi demarcado, respeitando-se como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica, seguindo o modelo experimental proposto inicialmente por McFARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965) e empregado em vários outros estudos, como por LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO (2002); ESTEVES JUNIOR, FERREIRA, LIEBANO (2004); PINFILDI *et al.*, (2005), BOSSINI *et al.*, (2009) (Figura 3).

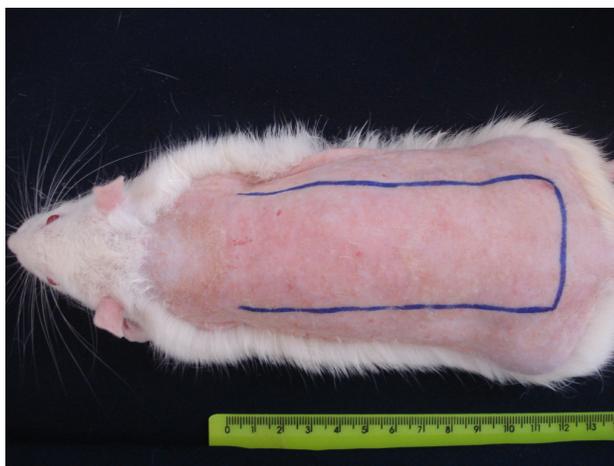


Figura 3 – Retalho planejado e delineado no dorso do animal com dimensões de 10 x 4cm.

Os retalhos foram elevados do dorso dos animais a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo a fáscia superficial, panículo carnosos e pele (McFARLANE, DeYOUNG, HENRY, 1965) (Figura 4).

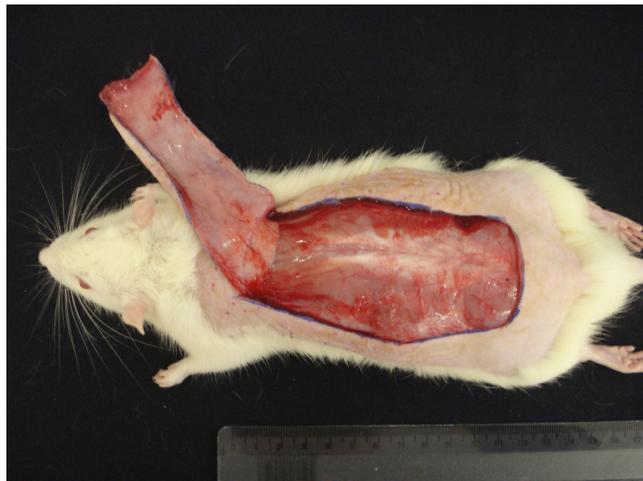


Figura 4 – Retalho cutâneo randômico de base cranial elevado.

Uma barreira plástica (filme F1) com as mesmas dimensões do retalho (10 X 4cm) foi interposta entre o retalho e o leito doador, impedindo a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito (KORLOF e UGLAND, 1966; KAUFMAN *et al.*, 1985) (figura 5).



Figura 5 – Posicionamento da barreira plástica entre o retalho e o leito doador.

Em seguida, foi realizada a sutura com pontos simples, utilizando fio de náilon monofilamentar 4-0, com distância de aproximadamente 1cm entre os pontos, retornando o retalho à mesma posição de origem (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; BOSSINI *et al.*, 2009) (figura 6).



Figura 6 – Retalho suturado após interposição da barreira plástica.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os animais do grupo CL foram anestesiados por mais 30 minutos e submetidos à simulação da radiação laser (o equipamento permaneceu desligado). Os animais dos grupos V30, V40, IV30, e IV40 também foram anestesiados por 30 minutos e receberam a radiação laser com $\lambda=660\text{nm}$ com fluência de 30 e 40J/cm² (V30 e V40), e radiação laser com $\lambda=780\text{nm}$ com fluência de 30 e 40J/cm² (IV30 e IV40).

Todos os animais foram tratados imediatamente após a operação, e nos 4 dias seguintes, em uma única aplicação por dia no mesmo horário todos os dias (figura 7).

Para a padronização dos pontos de aplicação do laser foi utilizado um molde plástico, que foi posicionado sobre o retalho, tendo como referência a região cranial e as margens laterais do mesmo, garantindo que a radiação laser se deu sempre nos mesmos pontos.

Nas aplicações foi utilizada a técnica pontual com contato, sendo a caneta do laser posicionada perpendicularmente com o retalho cutâneo (PINFILDI *et al.*, 2005; BOSSINI *et al.*, 2009).



Figura 7 – Técnica de aplicação pontual em contato utilizando molde.

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

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi avaliada no sétimo dia pós-operatório, por meio do método do gabarito de papel (SASAKI e PANG, 1980). O limite entre o tecido viável (pele macia, rósea, quente e com pêlos) e o tecido não viável (pele escurecida, fria e sem pêlos) foi estabelecido nos animais.

Um molde de todo o retalho foi traçado em papel vegetal (figura 8), onde se delimitou a área necrosada da área viável do retalho (figura 9). Logo após, o molde de papel vegetal correspondente ao retalho foi recortado e aferido em uma balança de precisão (erro de $\pm 0,0001$ g).

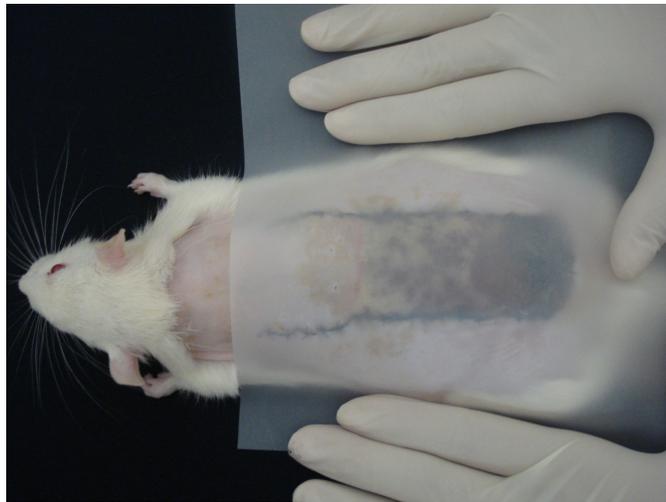


Figura 8 – Visualização da área a ser demarcada por meio do papel vegetal

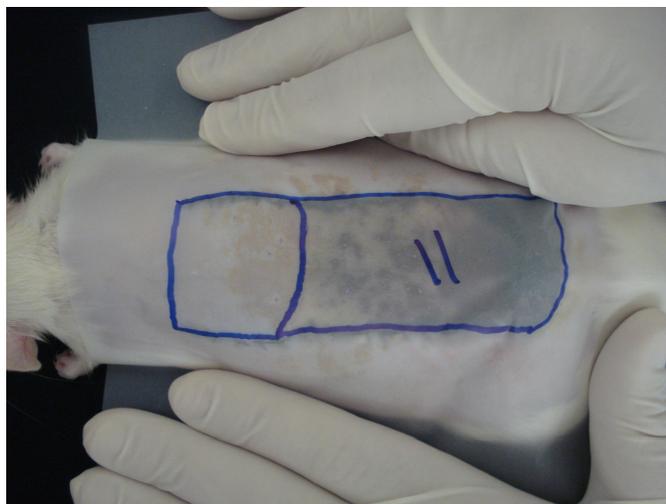


Figura 9 – retalho com delimitação entre área necrosada (com dois traços) e a área viável estandardizada

A área de necrose foi separada da área viável do desenho e também foi aferida. Para se encontrar a porcentagem da área de necrose foi aplicada a seguinte fórmula:

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

3.6 Coleta da Amostra do Retalho Cutâneo

Uma amostra do retalho cutâneo de todos os animais foi coletada no sétimo dia pós-operatório. Na tentativa de padronizar a coleta da amostra foi estabelecido logo acima do ponto mais alto de separação entre o tecido viável e o necrótico perpendicularmente a lesão com 1cm de largura. Todas as amostras foram retiradas com os animais anestesiados. A região colhida foi dividida em 3 partes, direita, central e esquerda (figura 10). A porção direita foi utilizada para análise de Zimografia e Western Blotting, e a porção central foi utilizada para histologia. As amostras de pele foram lavadas de 3 à 4 vezes em solução salina. Após a limpeza, foi feita a remoção de qualquer tipo de tecido periférico e demais artefatos visíveis.

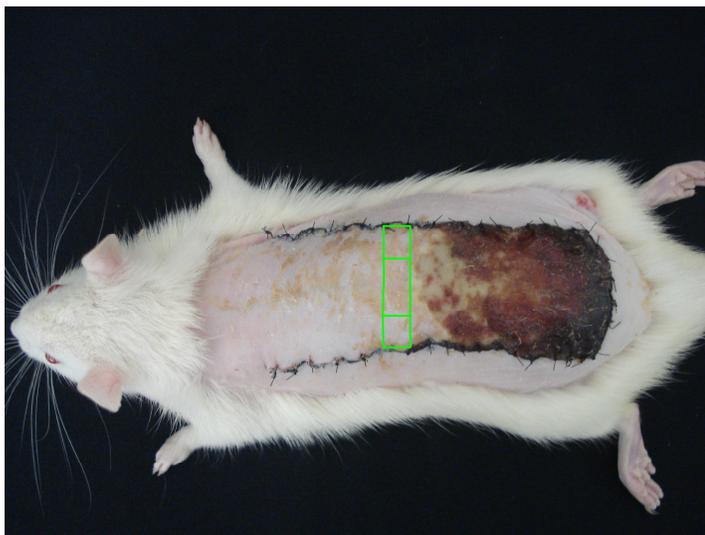


Figura 10 – Representação da amostra do retalho cutâneo coletado para estudo

3.7 Eutanásia dos animais e coleta de sangue

Ao término da avaliação da porcentagem da área de necrose e da coleta das amostras do retalho cutâneo, os animais foram mortos por exsanguinação sob anestesia.

Foram coletadas, aproximadamente, 3ml de amostra de sangue por punção intracardiaca. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio, sem anticoagulante para obtenção do soro, e posterior dosagem de NO. Elas foram mantidas em gelo e rapidamente centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min a 4°C e armazenadas em freezer -20°C.

3.8 Procedimento morfológico

Após a coleta, as peças foram armazenadas em potes individuais contendo solução de formaldeído a 10% para fixação, durante 24 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente também por 24 horas. Na seqüência, passaram por desidratação em soluções de álcool etílico a 70% e 100%. As peças foram mantidas imersas por 1 hora na primeira solução, o procedimento foi repetido por 8 vezes com duração de 1 hora cada, na segunda solução. Após os banhos de desidratação foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro, também por uma hora cada banho. Posteriormente as amostras passaram por banhos de parafina/xilol (1:1) e parafina 1 por 1h cada em seguida por parafina 2 por 2h.

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

3.9 Contagem dos vasos sanguíneos

Foram preparadas lamina histológicas de toda extensão do retalho destinado a esse objetivo (porção central). As amostras foram subdividida em 3 partes, para se obter uma visualização de porções em diferentes níveis (figura 11). Cada fatia foi fotografada em 3 campos aleatórios (total de 9 campos), num aumento de 40 vezes de objetiva, por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz marca ZEISS®.

As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ, no qual foram contadas as quantidades de vasos sanguíneos. A contagem foi realizada por duas avaliadoras treinadas, que não sabiam a identidade das lamina, evitando-se assim a possibilidade de indução dos resultados. Ao término da análise, os resultados foram comparados e foi obtida a média de vasos das avaliadoras.

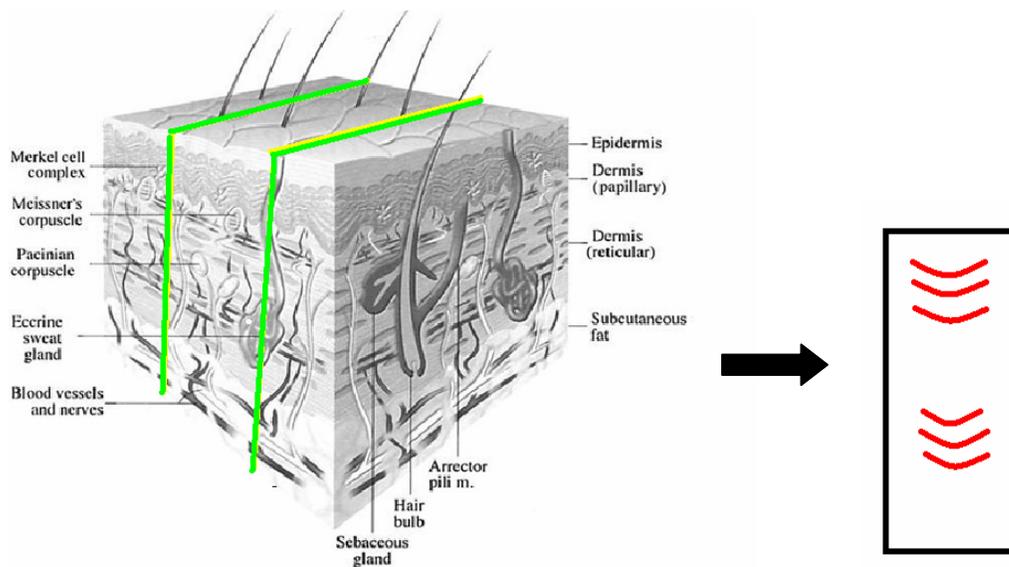


Figura 11 – Representação da subdivisão do retalho cutâneo (Gaboriau & Murakami, Skin Anatomy, Otolaryngologic Clinics of North America), dividido em 3 partes (em verde), e disposto nas lamina em diferentes porções (em vermelho).

3.10 Determinação da atividade de MMPs por zimografia

As amostras do tecido cutâneo foram maceradas e incubadas em 0,7 ml de tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 NaNO₃ e 0,01% de triton X – 100], o tampão de extração foi colocado numa centrífuga (30 minutos, 4°C em 13000 rpm). A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante. Vinte microgramas de proteína foram acrescidas de tampão de amostras (Laemly) e aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina.

Os géis de zimografia consistiram de SDS (10%) com gelatina (1 mg/ml). Após a corrida o gel foi lavado 1 vez durante 30 minutos em solução 2,5 de Triton X – 100 para remoção de SDS e foi incubado no tampão de substrato (Tris – HCL 50mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%, a 37°C, durante 24h. Após esse tempo foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1h e 30 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. As amostras também foram incubadas em EDTA para diferenciar a expressão de metalopeptidases ou de serinoproteínas. Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e o software Gene Tool da Syngene para a análise densitométrica das bandas.

3.11 Determinação Indireta do NO pela Dosagem de Nitrato

A determinação da concentração de óxido nítrico plasmático foi feita através de uma técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyser, Boulder CO. USA).

Alíquotas de 50 µl de amostra foram separadas para desproteíntização com 100 µl de etanol absoluto a 4°C e mantido por 30 min em freezer (-20°C) e, posteriormente, submetido à centrifugação (10000 rpm, 5 min) para posterior leitura no analisador. Cinco microlitros (5 µl) do sobrenadante desta amostra foram colocada na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é dragado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio (O₃), formando dióxido de nitrogênio (NO₂⁻). O NO₂⁻ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. Essa corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada corresponde a concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µM. Os valores de nitrato foram expressos em µM.

3.11.1 Dosagem de proteínas do plasma

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro, utilizando como padrão a albumida bovina (BSA, 1mg/ml).

3.12 Expressão de HIF-1 alpha por Western Blotting

Foi utilizado 50µg de proteína (da região correspondente ao lado direito) obtida a partir do extrato total dosadas pelo kit BCATM *Protein Assay* (Pierce). As amostras foram diluídas em tampão amostra (LAEMLY, com agente redutor, Betamercapto). O material foi fervido por 5 minutos e submetido à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho transferidor semi-seco (Bio-Rad). A membrana foi

bloqueada em solução de leite molico 5% diluída em PBS com 0,1% de Tween 20 (PBST) por 1 hora com agitação leve em temperatura ambiente. Posteriormente foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada com PBST. O anticorpo HIF -1 α primário (Santa Cruz) foi diluído em PBST com 0,5% de BSA (1:1000) *over night* e o anticorpo secundário foi diluído em PBST com 0,5% de BSA (1:2000) por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi revelada em filme após uso do Super Signal (Pierce)

3.13 Análise Estatística

Os dados foram apresentados por meio de técnicas descritivas, tais como gráficos e tabelas, na forma de média e desvio padrão, submetidos a análise de variância (ANOVA- One way). Na presença de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de *post-hoc* Tukey. Para todas as análises foi utilizado o programa Graph Pad Prism[®] versão 3, e o STATISTICA[®] 5.5.

Grupos comparados:

- Controle vs V30, V40, IV30, IV40
 - V30 vs V40
 - IV30 vs IV40
 - V30 vs IV30
 - V40 vs IV40
- } Mesmo comprimento de onda, com diferentes fluências;
- } Mesma fluência, em diferentes comprimentos de onda;

Não foi realizada a comparação de diferentes comprimentos de ondas concomitantemente com diferentes fluências, devido o objetivo. Portanto, não foram comparados:

- V30 vs IV40
- V40 vs IV30

PARTE II

ARTIGO I:

**“THE EFFECTS OF THE 660nm AND 780nm LASER IRRADIATION ON VIABILITY OF
RANDOM SKIN FLAP IN RATS” (Efeitos da irradiação laser 660nm e 780nm na
viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos)**
Photomedicine and Laser Surgery, outubro de 2009.

ARTIGO II:

**“EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER NA VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO
RANDOMICOS DE RATOS: MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2 E DA
EXPRESSÃO DE HIF-1 α DURANTE A ANGIOGÊNESE”**

Efeitos da Irradiação Laser 660 nm E 780 nm na Viabilidade do Retalho Cutâneo Randômico em Ratos

Vivian Cury¹; Paulo Sérgio Bossini¹; Renan Fangel¹; Jaqueline de Sousa Crusca²; Ana Claudia Renno³; Nivaldo Antonio Parizotto¹

¹ Laboratório de Eletrotermofototerapia, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Fisioterapia – Brasil – SP

Endereço: Rodovia Washington Luís, km 235 - CEP. 13565-905 – São Carlos – SP – Brasil.

viviancury@yahoo.com.br

² Departamento de Bioengenharia, Universidade de São Paulo.

Endereço: Av. Trabalhador São Carlense, 400, CEP. 13566-590 - São Carlos – SP – Brasil.

³ Departamento de Biociência, Universidade Federal de São Paulo, Av. Ana Costa, 95, Santos – SP – Brasil.

Objetivo: Alguns estudos têm demonstrado que a laserterapia é capaz de aumentar a viabilidade do retalho cutâneo, diminuindo a área de necrose e aumentando a neoangiogênese. No entanto, os mecanismos pelos quais o laser atua sobre as células não são completamente compreendidos. O presente estudo investigou os efeitos de dois diferentes comprimentos de onda com fluências de 30 e 40 J/cm², sobre a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos.

Material e Métodos: Foram utilizados Sessenta ratos machos Wistar distribuídos nos seguintes grupos (n = 12 cada grupo): grupo controle, grupo irradiado com 660 nm, a 30 J/cm²; grupo irradiado com 780 nm, a 30 J/cm², grupo irradiado com 660 nm, a 40 J/cm² e grupo irradiado com 780 nm, a 40 J/cm². O retalho cutâneo foi realizado no dorso de todos animais estudados e foi interposta uma folha plástica entre o retalho e o leito doador. A irradiação laser foi feita imediatamente após a cirurgia e nos dias 1, 2, 3 e 4 pós-cirurgia. A porcentagem da área de necrose do retalho foi calculada no 7º dia pós-operatório. **Resultados:** o grupo controle mostrou uma área de necrose de 62, 83%. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos irradiados e o grupo controle. **Conclusão:** Este estudo mostrou que o laser 660nm e 780nm nas doses de 30 e 40J/cm² não foram eficientes para diminuir a área de necrose de retalhos cutâneos em ratos.

INTRODUÇÃO

O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico comum utilizado em cirurgias plásticas e de reconstrução. No entanto, muitas complicações relacionadas à cirurgia poderiam levar ao fracasso do retalho¹.

Complicações na viabilidade do retalho podem surgir por diversas causas. O prejuízo na nutrição vascular de um retalho de padrão axial pode resultar em isquemia ou congestão venosa, formação de hematoma ou infecção, podendo levar à uma necrose total ou parcial do

retalho². As tentativas para maximizar a capacidade de sobrevivência do retalho incluem algumas intervenções como a melhoria do estado nutricional do paciente, evitar eletrocauterização, garantir hemostasia adequada e evitar lesão por compressão no manuseio do retalho². Terapias inovadoras com o objetivo de aumentar o fluxo sanguíneo para o retalho têm sido investigadas, incluindo a terapia laser de baixa intensidade³ (LLLT).

Muitos autores mostraram os efeitos positivos do LLLT sobre a viabilidade do retalho cutâneo^{4,5}. Bossini *et al.*³, Prado *et al.*⁴ e Pinfieldi e cols.⁵ demonstraram que a irradiação laser é capaz de produzir um aumento significativo na viabilidade do retalho cutâneo, diminuindo a área de necrose. Os efeitos do laser estão baseados na estimulação da atividade mitocondrial pela luz, que estimula a proliferação celular promove absorção de fibrina a partir do tecido lesado e aumenta a conversão de miofibroblastos em fibroblastos, o que poderia explicar o aumento de sobrevivência do retalho cutâneo após a irradiação laser. Além disso foi demonstrado que a irradiação laser pode estimular a angiogênese na área do retalho e produzir adequada perfusão sanguínea^{3,7}. É sabido que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é essencial no processo de cicatrização e restabelecimento da circulação no limite da necrose permitindo o reparo tecidual^{8,9}.

Apesar de vários trabalhos demonstrarem os efeitos positivos da LLLT sobre a viabilidade do retalho cutâneo, há carência de protocolos clínicos e uma vasta gama de doses utilizadas por diferentes autores. Alguns trabalhos encontraram redução da área de necrose com doses baixas como $3\text{J}/\text{cm}^2$ ^{4,5}, enquanto outros encontraram o mesmo efeito usando doses mais elevadas, como $24\text{J}/\text{cm}^2$ ³. No entanto, a dose ideal e o comprimento de onda capaz de aumentar a viabilidade do retalho ainda são controversos.

A LLLT com a finalidade de regeneração tecidual tem sido amplamente utilizada nos últimos anos. No entanto, o conhecimento dos mecanismos pelos quais a terapia laser atua

ainda é limitado^{9,10}. Além disso, são raros os estudos explorando os efeitos de diferentes potência, densidades de energia e de comprimento de onda, especialmente em modelos in vivo^{11,12}. Para a utilização segura e eficaz do laser como modalidade terapêutica é necessário uma investigação dos efeitos e das características dose-resposta desta terapia. Poucos estudos investigaram os efeitos de doses altas na viabilidade do retalho cutâneo. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a área de necrose do retalho cutâneo em ratos após irradiação com 660nm e 780nm, nas fluências de 30J/cm² e 40J/cm².

MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos. Sessenta ratos machos adultos (Wistar, de 12 semanas, 260-320g) foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, com 12 animais cada: grupo 1 (grupo controle), grupo 2 (irradiado com laser de 660nm, 30J/cm²), grupo 3 (irradiado com laser de 780nm, 30J/cm²), grupo 4 (irradiado com laser de 660nm, 40J/cm²) e grupo 5 (irradiado com laser de 780nm, 40J/cm²). Todos os animais foram anestesiados com ketamina (95mg/kg) e xilazina (12mg/kg) intraperitoneal e também foram depilados. Um retalho cutâneo randômico, medindo 10 x 4cm foi criado com uma base cranial no dorso de cada rato⁵. Uma barreira de plástico com as mesmas dimensões foi colocada entre o retalho e o seu leito doador. Os retalhos foram fechados com pontos simples com fio monofilamentar de nylon 4-0.

Os animais receberam irradiação laser imediatamente após o procedimento operatório e nos 4 dias subseqüentes, em 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho. Foi utilizado um laser de baixa intensidade com 660 e 780nm (MM optics-twim laser[®]), de modo contínuo,

feixe com 4mm de diâmetro, 40mW de potencia. A fluência utilizada foi de 30J/cm² (durante 30s, energia total de 28,8J) e 40J/cm² (durante 40s, energia total de 38,4J).

ANÁLISES

Necrose do Retalho Cutâneo

A porcentagem de área de necrose do retalho cutâneo foi calculada no 7º dia pós-operatório por meio do gabarito de pape. Os ratos foram sedados e do limite entre o tecido viável e tecidos necróticos foi demarcada nos animais³. Um molde de todo o retalho foi traçado em papel vegetal, onde se delimitou a área necrosada da área viável do retalho, o molde foi recortado e aferido em uma balança de precisão (erro de +/- 0,0001g). Depois disso, utilizou-se a seguinte equação:

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

Após este procedimento, os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia.

Análise Estatística

Os dados referentes às análises foram submetidos ao teste de variância (ANOVA) e estão apresentados em médias e desvios-padrão. O nível de significância aceito foi o de 5% (p <0,05).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as médias e o desvio padrão da área de necrose encontrada para cada grupo e os resultados da análise estatística. Os animais não irradiados (grupo controle) apresentaram uma área de necrose média de 62,83%. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos irradiados e tratados no grupo controle ($p = 0,1737$). O laser de 780nm, 30 J/cm² (grupo 3) produziu uma menor área de necrose (54,6%), porém o valor não foi estatisticamente significativo.

Tabela 1: Porcentagem da área de Necrose

Grupos	Média (%)	DP	Porcentagem mínima de Necrose	Porcentagem máxima de Necrose	Significância
G1	62,83	10,15	44,72	80,69	NS
G2	64	9,6	49,90	75,70	NS
G3	54,6	12,9	29,24	68,09	NS
G4	58,4	7,8	44,42	67,66	NS
G5	62,87	10,14	44,95	70,82	NS

G1: controle; G2: 660nm, 30J/cm²; G3: 780nm, 30J/cm²; G4: 660nm, 40J/cm²; G5: 780nm, 40J/cm²; DP: desvio padrão; NS: Não significativo.

DISCUSSÃO

Foi investigado os efeitos de dois diferentes comprimentos de onda do laser e duas diferentes fluências sobre a viabilidade do retalho cutâneo. Os resultados mostraram que nenhum dos comprimentos de onda e nenhuma das doses utilizadas produziu qualquer efeito sobre a área de necrose do retalho.

Os resultados deste trabalho não corroboram com os estudos encontrados na literatura, que têm demonstrado que a laserterapia é eficiente para diminuir a área de necrose do retalho

e aumentar a viabilidade^{3,4,5}. Pinfildi *et al.*⁵ e Amir *et al.*¹³, encontraram diminuição da necrose do tecido do retalho cutâneo após a irradiação do laser de 632,8nm, com uma fluência de 3J/cm² e 2,9J/cm², respectivamente. Bossini *et al.*³ demonstraram uma curva dose-resposta da viabilidade do retalho. Os autores investigaram os efeitos do laser de 670nm em diferentes fluências na área de necrose e no crescimento dos vasos sanguíneos, utilizando o mesmo protocolo do presente estudo. Eles encontraram uma menor área de necrose e um maior número de vasos sanguíneos após a irradiação com 3, 6, 12 e 24J/cm², com a melhor resposta na maior fluência³.

Apesar dos presentes resultados não apresentarem diminuição da área de necrose, após a irradiação do laser, nossas descobertas suportam a relação de células / tecidos e fluência / comprimento de onda resposta específica para terapias do laser. Por exemplo, Meireles *et al.*¹⁴ encontraram que o laser de 660nm, com uma dose de 20J/cm² foi mais eficaz do que o laser de 780nm sobre a aceleração da cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos diabéticos. Moore *et al.*¹⁵ observaram um aumento da proliferação de fibroblastos após irradiação laser com 665nm e 675nm, enquanto que um comprimento de onda de 810nm foi inibitória. Em outro estudo, Pinheiro *et al.*¹⁶ relataram que a irradiação de células de carcinoma de laringe com laser no comprimento de onda 670nm, estimulou a proliferação dessas células quando comparada com a irradiação no comprimento de onda 635nm e de células não irradiadas.

A laserterapia envolve diversos parâmetros, tais como: comprimento de onda, fluência total, a potência, frequência de tratamento, modo pulsado ou onda contínua^{11, 17}. Um dos pontos importantes demonstrados por vários estudos em cultura de celular^{12,18}, modelo animal¹⁹, e estudos clínicos, é o conceito de uma dose-resposta relacionado com a densidade de energia total depositada no tecido¹¹. Além disso, tem sido postulado que existe uma

fluência ideal, sendo que as fluências inferiores a este valor ótimo ou maior do que o valor ideal terá um resultado terapêutico diminuído, ou altas fluência podem resultar em um resultado negativo^{11,18}.

É possível que as irradiações com comprimento de onda 670nm e 780nm não tenham provocado qualquer alteração no metabolismo tecidual dos retalhos cutâneos, deixando de demonstrar as alterações na área de necrose dos grupos tratados comparados ao controle. Além disso, pode-se sugerir que a quantidade de energia oferecida ao tecido foi maior do que a dose ideal necessária para produzir um aumento na viabilidade do retalho. Como observado em um estudo anterior do nosso grupo³, a dose de 24J/cm² foi eficiente para aumentar a viabilidade do retalho. Provavelmente, a dose de 30 e 40J/cm² foram excessivas e poderiam ter promovido uma inibição da proliferação de fibroblastos, células e neoangiogênese, evitando o aumento da viabilidade do retalho cutâneo.

Apesar dos resultados encontrados no presente estudo, nós consideramos que a metodologia utilizada encontra-se compatível com os relatórios precedentes encontrados na literatura^{3,4,5}. O filme plástico usado entre o retalho e o leito doador evita a revascularização do retalho através dos vasos do leito, garantindo a isquemia homogênea^{20,21}. Além disso, o gabarito de papel é um método simples e rápido para medir áreas de necrose e requer apenas um papel transparente e uma balança precisão^{3,4}. A técnica de irradiação pontual por contato utilizada (na superfície de retalho e em torno dele) também foi adequada³. Ressalta-se algumas limitações do nosso trabalho. Muitos autores sugerem que a laserterapia aumenta o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e do fluxo de sanguíneo^{19,22}. Estes efeitos são essenciais para o processo de cicatrização e restabelecimento da circulação nos limites da necrose isquêmica da lesão. Portanto, a inclusão da avaliação da formação de novos vasos

sanguíneos (artérias e capilares) e o fluxo de sangue poderiam trazer informações mais específicas sobre a distribuição do fluxo sanguíneo.

Os dados apresentados são úteis para o estabelecimento de parâmetros de tratamento, no entanto, existe a necessidade de mais investigações sobre os diferentes mecanismos de ação do laser, do regime de dosagem segura e de comprimentos de onda efetivos para a aplicação clínica.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o laser 660nm e 780nm, nas doses de 30 e 40J/cm² não tem qualquer efeito sobre a viabilidade do retalho cutâneo. Estes dados destacam a importância de usar o laser de comprimento de onda e a dosagem adequada para se obter uma melhor resposta do tecido. Os estudos que investigam os efeitos de diferentes fluências do laser na reparação tecidual são importantes para determinar a eficácia da terapia com laser. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos de ação que possam explicar os efeitos do laser sobre a viabilidade do retalho cutâneo.

REFERÊNCIAS

1. Hofeling, A.D., Bello, G., Jackson, I., Jackson, AH, Kim E.(2006) Hemoglobin-based oxygen carrier does not improve survival of ischemic rat island groin flaps. *J Invest Surg.* 19:299-305.
2. Hart, K; Baur, D.; Hodam, J.; Lesoon-Wood, L.; Parham, M.; Keith, K.; Vazquez, R.; Ager, E.; Pizarro, J. (2006) Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope.* 116:522-8.
3. Bossini, P.S., Fangel, R.; Habenschus, R.M.; Renno, A.C.; Benze, B.; Zuanon, .JA.; Parizotto, N.A. (2008). Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* Epub ahead of print.

4. Prado R.P., Pinfildi, C.E., Liebano R.E., Hochaman B.S., Ferreira L.M. (2005) Diode laser in viability of random skin flap in rats. *Photomedicine Laser Surg* 23: 115, Abstract.
5. Pinfildi C.E., Liebano, R.E., Hocheman B.S., Ferreira L.M. (2005) Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med* 37: 74-77.
6. Coombe, A. R.; Ho, C.; Philips J.R. (2006) Chapple, C.C. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin. Orthod. Research* 4: 3-14.
7. Kubota, J. (2002) Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci.* 17: 146-153.
8. Corazza, A.V; Jorge, J., Kurachi, C., Bagnato, V. (2007) Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. *Photomed Laser Surg.*, 25: 102–106.
9. Kreisler, M., Al Haj, H. (2003). Temperature changes induced by 809 nm GaAlAs laser at the implant-bone interface during simulated surface decontamination. *Clin. Oral Implant Research.*14, 91-6.
10. Werneck, C.E., Pinheiro, A. L., Pacheco, M.T., Soares, C.P. (2005) Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic *in vitro* study. *Photomedicine Laser Surg.*23, 300-3.
11. Demidova-Rice, T., Salomatina, E.V. Yaroslavsky, A.N. Herman, I, Hamblin, R. (2007) Low-Level Light Stimulates Excisional Wound Healing in Mice *Lasers in Surgery and Medicine* 39:706–715.
12. Renno, A.C.; McDonnell, P.A.; Parizotto, N.A.; Laakso, E.L. (2007) The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 25:275-80
13. Amir A., Solomon A.S., Giler S., Cordoba M., Hauben D.J. (2000) The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* 53: 58-62.
14. Meireles, G., Santos, J.N., Chagas, P., Moura, P., Pinheiro, A.L.B. (2008) Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats, *Photomedicine Laser Surg.* 26: 47-54.
15. Moore, P., Ridgway, T.D., Higbee, R.G., Howard, E.W., Lucroy, M.D. (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. *Lasers Surg Med.* 1,8-12.
16. Pinheiro, A.L., Carneiro, N.S., Vieira, A.L., Brugnera, A, Jr, Zanin, F.A., Barros, R.A., Silva, P.S. (2002) Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *in vitro* study. *J Clin Laser Med Surg.* 20, 23-6.
17. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. (2005) Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*; 33:334–340.
18. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. (1996) A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J*; 41:188–192.

19. Enwemeka, C.S., Conhen-Kornberg, E.; Duswalt, E.P.; Weber, D.M.; Rodriguez, I.M. (1994) Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. *Laser Ther*; 6:181-188.
20. Wilden, L., Karthein R. (1998) Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg* 16: 159-165.
21. Kipshidze N., Nikolaychik V., Keelan M.H., Shankar L.R., Khanna L., Kornowski R., Leon M., Moses J. (2001) Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.*; 28: 355-364.
22. Salate, A.C.B., Barbosa, G., Gaspar, P., Carrinho, P., Koeke, P, Parizotto, N. (2005). Effect of In-Ga-Al-P Diode Laser Irradiation on Angiogenesis in Partial Ruptures of Achilles Tendon in Rats. *Photomedicine Laser Surg* 23, 470–475.

“EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER NA VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO
RANDÔMICO DE RATOS: MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2 E DA
EXPRESSÃO DE HIF-1 DURANTE A ANGIOGÊNESE”

VIVIAN CURY¹, LÍVIA A. RIBEIRO¹, PAULO BOSSINI¹, JAQUELINE CRUSCA², ANA
IOCHABEL SOARES MORETTI³, NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO¹

¹ Laboratório de Eletrotermofototerapia, Universidade Federal de São Carlos, Departamento
de Fisioterapia – Brasil – SP

Endereço: Rodovia Washington Luís, km 235 - CEP. 13565-905 – São Carlos – SP – Brasil.
viviancury@yahoo.com.br

² Departamento de Bioengenharia, Universidade de São Paulo.

Endereço: Av. Trabalhador São carlense, 400, CEP. 13566-590 - São Carlos – SP – Brasil.

³ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, São Paulo – SP - Brasil.

RESUMO

Introdução: Os retalhos cutâneos são amplamente utilizados na cirurgia plástica e reparadora. Uma das principais e a mais temida complicação do retalhos cutâneos é a isquemia. Dentre os recursos utilizados com o intuito de aumentar a viabilidade do retalho, o *laser* de baixa intensidade é uma alternativa de tratamento, uma vez que pode promover um aumento da microcirculação e da neoformação vascular. **Objetivo:** Verificar o efeito do laser de baixa intensidade em dois comprimentos de onda (660nm e 780nm), com fluências de 30 e 40J/cm², na vascularização, atividade da metaloproteinase (MMP-2), níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) e expressão de HIF-1 α , no retalho cutâneo randômico em ratos. **Métodos:** Sessenta ratos da linhagem *Wistar* foram utilizados neste estudo, sendo distribuídos em 5 grupos (n=12): grupo controle, grupo irradiado com 660nm, 30J/cm²; grupo irradiado com 660nm, 40J/cm²; grupo irradiado com 780nm, 30J/cm², e grupo irradiado com 780nm, 40J/cm². O retalho cutâneo foi realizado no dorso dos animais com dimensões de 10 X 4cm e uma barreira plástica foi interposta entre o retalho e o leito doador. Os animais receberam irradiação laser de diodo com meio ativo composto por AsGaAl, potência de 40mW, da marca MMOptic Ltda[®], imediatamente após a cirurgia e nos 4 dias seguintes, utilizando-se a técnica pontual em contato em 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho. **Resultado e Conclusão:** Foi observado um aumento da expressão de HIF-1 α nos grupos irradiados com 40J/cm² e um aumento significativo (p<0,05) na contagem dos vasos sanguíneos e na atividade da MMP-2 dos grupos irradiados comparado com o grupo controle, sendo que o grupo irradiado com 780nm, 40J/cm², apresentou melhor resposta.

Palavras-chave: LLLT, neovascularização, retalhos cirúrgicos.

INTRODUÇÃO

Retalhos cutâneos são segmentos de pele obtidos de uma área doadora e transferidos para uma região receptora, mantendo uma conexão temporária ou definitiva, por meio de um pedículo de onde vem o suprimento sanguíneo¹. Sua rotação ou transposição é amplamente utilizada em fechamento de defeitos cirúrgicos; no entanto, a necrose parcial é ainda um grave problema devido ao inadequado suprimento sanguíneo².

Durante as últimas décadas, muitas tentativas têm sido feitas para melhorar a sobrevivência do retalho, estes incluíram o uso de agentes farmacológicos^{3,4}, e também recursos não farmacológicos como acupuntura e eletroacupuntura⁵, correntes elétricas de baixa frequência polarizada⁶ e não polarizadas^{7,8}, e o laser de baixa intensidade⁹⁻¹⁶. Alguns pesquisadores mostraram que a irradiação laser de baixa intensidade melhora a circulação^{9,11,17}, promove a angiogênese¹⁵, resultando numa melhor sobrevivência do retalho. Portanto a angiogênese é um processo potencialmente importante contribuindo para a segurança e sobrevivência do retalho¹⁸.

Desta maneira, muitos trabalhos vêm utilizando o laser de baixa intensidade no retalho cutâneo com o intuito de aumentar sua viabilidade, sendo que a maioria deles obteve resultados positivos. Porém há uma grande variedade de parâmetros utilizados, como por exemplo, comprimentos de onda, os ensaios trazem diversos como: 632,8 nm^{10,12,13}, 670 nm^{15,19,20}, 830 nm^{9,11,14,17,16}, 904 nm²⁰, 10.600 nm¹⁰. As investigações divergem não só com relação aos parâmetros do laser, mas também ao delineamento experimental, onde alguns estudos utilizaram a barreira plástica como interface entre o retalho e o leito^{13-16,19,20}, e outros realizaram sem barreira plástica^{9,10,12,21}, ou realizaram um retalho axial¹⁷. A diversidade continua quando observamos, número de pontos irradiados; total de aplicações; potência e outros aspectos consequentes destes.

Embora, os resultados muitos resultados sejam positivos, tantas variáveis não permitem discernir qual o parâmetro ideal e os efeitos da terapia laser na utilização deste modelo experimental. Sendo a isquemia uma complicação indesejável, trazendo prejuízo e fracasso ao tratamento proposto, o laser de baixa intensidade tem sido utilizado para aumentar o fluxo sanguíneo e promover a angiogênese, com o intuito de aumentar a viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.

Muitos estudos evidenciam alguns mecanismos de ação do laser relativos a indução de angiogênese, no entanto há uma falta de dados e de análises que facilitariam a compreensão de seus efeitos e nos permitiram identificar os mecanismos moleculares envolvidos na ação do laser sobre o tecido. Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram a concentração sistêmica de NO, a atividade de MMP-2 ou a expressão de HIF-1 α , em retalho cutâneo randômico em ratos tratados com laser.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sessenta ratos machos, da linhagem Wistar, com três meses de idade e massa corporal variando de 260 a 320 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), foram utilizados neste estudo. Os experimentos foram conduzidos segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal²² e aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar CEEA/UFSCar (parecer 10/2008).

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais. Grupo Controle (submetido a simulação da irradiação laser), grupo V30 (irradiação laser 30J/cm², 660nm), V40 (irradiação laser 40J/cm², 660nm), IV30 (irradiação laser 30J/cm², 780 nm), IV40 (irradiação laser 40J/cm², 780nm).

Procedimento Cirúrgico e Delineamento Experimental

Os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (95mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal e em seguida tiveram o dorso depilado. Um retalho cutâneo de base cranial foi planejado e realizado no dorso de cada animal com dimensões de 10 X 4cm. Uma barreira plástica com as mesmas dimensões do retalho foi colocada entre o retalho e o leito doador¹³. O retalho foi fechado utilizando fio de náilon monofilamentar 4-0.

Os animais receberam irradiação laser após a cirurgia e no 1º, 2º, 3º e 4º dia pós-operatório, em 24 pontos distribuídos sobre e ao redor do retalho. Foi utilizado um laser de baixa intensidade com 660 e 780nm (MM optics-txim laser[®]), de modo contínuo, feixe com 4mm de diâmetro, 40mW de potencia. A fluência utilizada foi de 30J/cm² (durante 30s, energia total de 28,8 J) e 40J/cm² (durante 40s, energia total de 38,4J).

Contagem dos vasos sanguíneos

Foram coletadas amostras do retalho cutâneo de todos os animais no sétimo dia pós-operatório. Uma amostra com 1cm de largura perpendicularmente à lesão, foi retirada logo acima da linha de transição do tecido viável e do necrótico. Em seguida as peças foram fixadas em formaldeído a 10%, incluídas em blocos de parafina e cortadas com espessura de 6µm. Os cortes foram montados em lâminas histológicas fixados e corados com hematoxilina e eosina (HE), e posteriormente fotografados num aumento de 40 vezes de objetiva. As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ, no qual foram contadas as quantidades de vasos sanguíneos.

Determinação da atividade de MMPs por zimografia

As amostras do tecido cutâneo foram maceradas e incubadas em 0,7 ml de tampão de extração [10mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO₃ e 0,01% de triton X – 100], o

tampão de extração foi colocado na centrífuga (30 minutos, 4°C em 13000 rpm). A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo as instruções do fabricante. Vinte microgramas de proteína foram acrescidas de tampão de amostras (Laemly) e aplicadas em gel de 10% de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina. Os géis de zimografia consistiram de SDS(10%) com gelatina (1mg/ml). Após a corrida o gel foi lavado 1 vez durante 30 minutos em solução 2,5 de Triton X – 100 para remoção de SDS e incubado no tampão de substrato (Tris – HCL 50mM pH 8,0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0,02%, a 37°C, durante 24h. Após esse tempo foi corado com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad) por 1h e 30 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. As amostras também foram incubadas em EDTA para diferenciar a expressão de metalopeptidases ou de serinoproteínas. Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e o software Gene Tool da Syngene para a análise densitométrica das bandas. Foram utilizadas 3 amostras de cada grupo (n=3).

Determinação Indireta do NO pela Dosagem de Nitrato

A determinação da concentração de óxido nítrico plasmático foi feita através de uma técnica de quimioluminescência NO/ozônio, utilizando-se um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyser, Boulder CO. USA). O conteúdo de NO foi apresentado em micromolar de nitrato formado por miligrama de proteína.

Expressão de HIF-1 alpha por Western Blotting

Foi utilizado 50µg de proteína (da região correspondente ao lado direito) obtida a partir do extrato total dosadas pelo kit BCATM Protein Assay (Pierce). As amostras foram diluídas em tampão amostra (LAEMLY, com agente redutor, Betamercapto). O material foi

fervido por 5 minutos e submetido à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho transferidor semi-seco (Bio-Rad). A membrana foi bloqueada em solução de leite mólico 5% diluída em PBS com 0,1% de Tween 20 (PBST) por 1 hora com agitação leve em temperatura ambiente. Posteriormente foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada com PBST. O anticorpo HIF -1 α primário (Santa Cruz) foi diluído em PBST com 0,5% de BSA (1:1000) e incubado *over night* e o anticorpo secundário foi diluído em PBST com 0,5% de BSA (1:2000) por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi revelada em filme após uso do Super Signal (Pierce).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e submetidos a análise de variância (ANOVA- One way). Na presença de diferença significativa ($p < 0,05$), foi aplicado o teste de *post-hoc* Tukey.

RESULTADOS

Contagem dos Vasos Sanguíneos

Os dados apresentados na tabela 1, referen-se à análise descritiva dos números de vasos sanguíneos por grupo.

Tabela 1 - Dados descritivos da contagem de vasos sanguíneos por grupos

Grupos	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
CL	106,7	88,5	122,5	14,52
V30	100,1	77,5	139	20,1
V40	130,8	105	150,5	20,1
IV30	148,8	117	183,5	25
IV40	156,25	131	180	19,9

CL- Placebo; V30- 30J/cm², 660nm; V40 - 40J/cm², 660nm; IV30 - 30J/cm², 780nm; IV40 - 40J/cm², 780nm

As comparações obtidas se apresentam na figura 1. Na análise dos vasos sanguíneos, pode-se notar que houve um aumento em número de vasos dos grupos V40, IV30, IV40 quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Quando comparadas as diferentes fluências do laser 660nm (vermelho) de 30J/cm² e 40J/cm², observou-se alterações significativas ($p < 0,05$). Apenas a fluência de 40J/cm² do laser vermelho foi capaz de promover o aumento do número de vasos. Não foram observadas alterações do número de vasos quando comparamos as diferentes fluências do laser 780nm (infravermelho) de 30J/cm² e 40J/cm². No entanto, quando comparamos as mesmas fluências dos diferentes comprimentos de onda (V40 vs IV40, $p < 0,05$ e V30 vs IV30, $p < 0,05$), percebemos que os grupos irradiados com infravermelho em ambas as fluências obtiveram melhor desempenho.

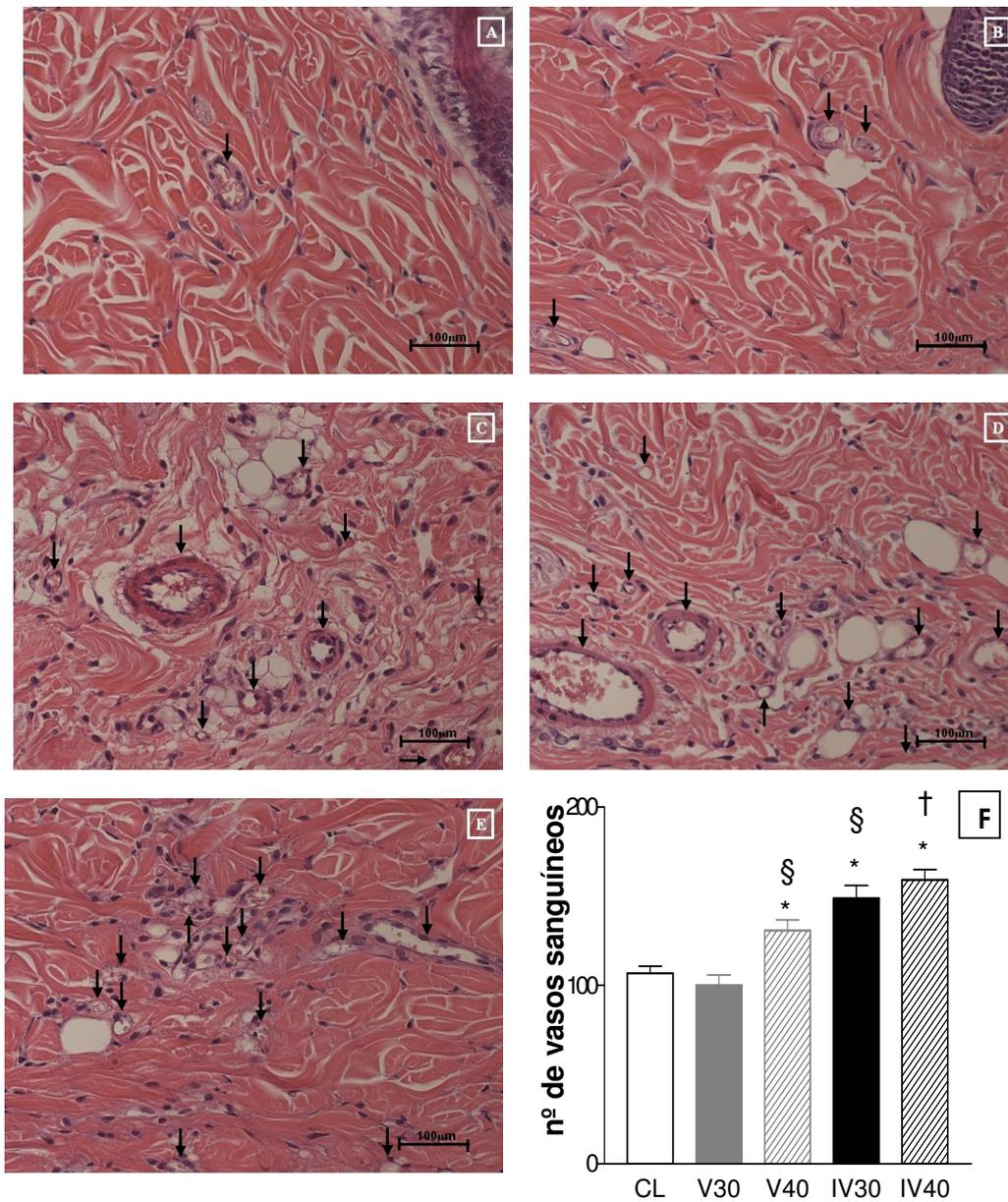


Figura 1 - Número de vasos sanguíneos por grupo. (A) CL=Placebo; (B) V30= 30J/cm², 660nm; (C) V40= 40J/cm², 660nm; (D) IV30= 30J/cm², 780nm; (E) IV4 = 40J/cm², 780nm); (F) Gráfico mostrando análise do numero de vasos. * p<0,05 vs CL; § p<0,05 vs V30; †p<0,05 vs V40;

Zimografia

A análise de Zimografia mostrou diferença na intensidade da atividade proteolítica das bandas (figura 2). A análise quantitativa da densidade das bandas foi realizada sem a separação das mesmas (72 kDa : Pró – MMP-2, 66 kDa: intermediária – MMP-2, e 64 kDa: ativa MMP-2) (figura 2). A atividade da MMP-2 apresentou um aumento nos grupos V40, IV30, IV40 quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Quando comparadas as diferentes fluências do laser 780nm (infravermelho), 30J/cm² e 40J/cm², observou-se que o tecido tratado com 40J/cm² teve maior atividade de MMP-2 ($p < 0,05$ vs 30J/cm²). Não foram observadas diferenças entre as fluências de 30J/cm² e 40J/cm do laser 660nm (vermelho). Quando comparado o comprimento de onda na mesma fluência (V30 vs IV30, $p < 0,05$ e V40 vs IV40, $p < 0,05$), os grupos irradiados com laser infravermelho apresentaram um aumento de atividade em relação aos grupos irradiados com laser vermelho (660nm).

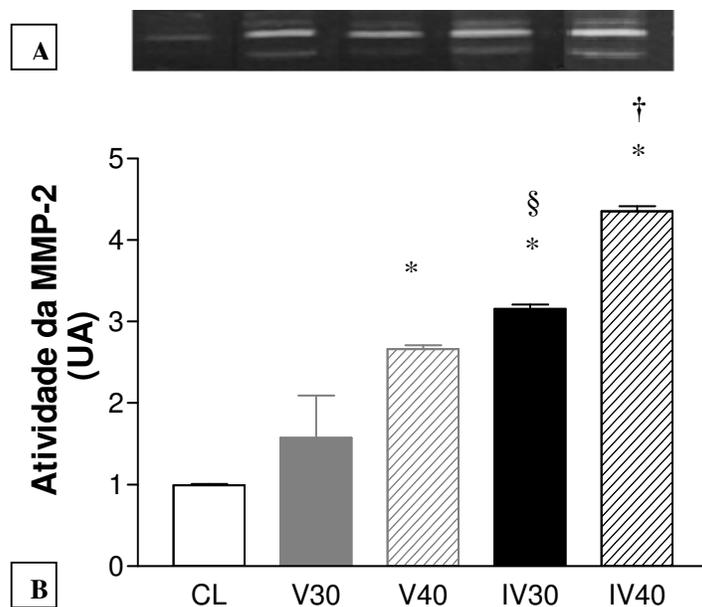


Figura 2 – Atividade da MMP-2 nos grupos. (A) Zimograma; (B) Gráfico mostrando atividade da MMP-2 nos diferentes grupos (CL- Placebo; V30- 30J/cm², 660nm; V40 – 40J/cm², 660nm; IV30 - 30J/cm², 780nm; IV40 - 40J/cm², 780nm). * $p < 0,05$ vs CL; § $p < 0,05$ vs V30, † $p < 0,05$ vs V40 e IV30.

Análise Plasmática dos níveis de Nitrato (NO)

Os níveis plasmáticos de NO foram dosados de forma indireta pela análise da concentração de nitrato. Não foram observadas alterações nos níveis NO plasmáticos (figura 3).

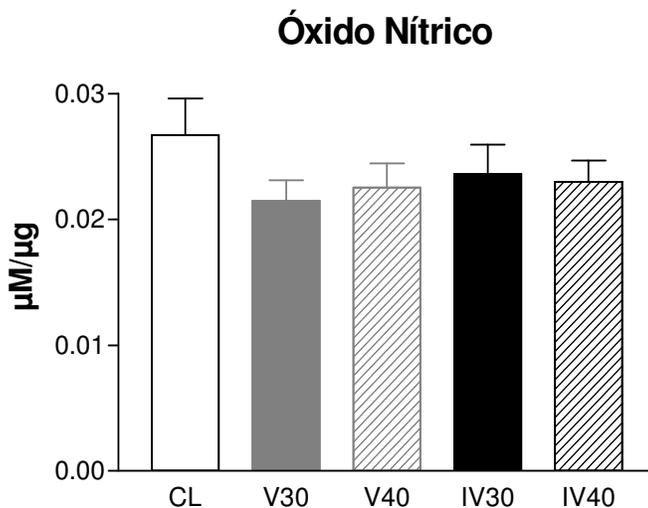


Figura 3 - Análise da concentração de Oxido Nítrico plasmático (CL - Placebo; V30- 30J/cm², 660nm; V40 – 40J/cm², 660nm; IV30 – 30J/cm², 780nm; IV40 – 40J/cm², 780nm).

Análise da Expressão de HIF-1 α por Western Blotting

A figura 4 mostra a expressão protéica do fator de transcrição HIF-1 α . Os grupos irradiados com fluência de 30J/cm², independente do comprimento de onda utilizado, não apresentaram alterações na expressão de HIF-1 α em relação ao controle. A fluência de 40J/cm² em qualquer comprimento de onda, exibiu um aumento na expressão de HIF-1 α quando comparado ao controle. Em relação a um dado comprimento de onda, quando comparadas as duas fluências aplicadas (30J/cm² e 40J/cm²), observo-se que a fluência de 40J/cm² é mais eficaz em aumentar a expressão de HIF-1 α . Este dado foi analisado

qualitativamente, pois não foi possível fazer teste de variância devido o número reduzido de amostras usadas para essa análise (2 animais por grupo).

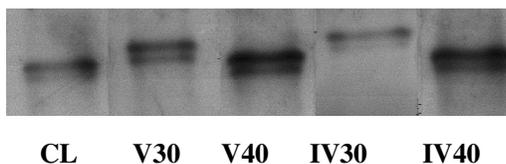


Figura 4 – Expressão de HIF-1 α

DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade é um recurso que se encontra num processo de avaliação de seus reais efeitos, para confirmar seus mecanismos de ação e determinar os parâmetros ideais de aplicação para diferentes tecidos. No presente trabalho investigou-se os efeitos dos *lasers* vermelho (660nm) e infravermelho (780nm) sobre a viabilidade de retalho cutâneo randômico de ratos. Utilizando diferentes fluências, 30J/cm² e 40J/cm², observou-se que os lasers de baixa intensidade foram capazes de modular a resposta angiogênica relativa a hipóxia.

Na literatura, os vários estudos sobre a utilização do laser de baixa intensidade e viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos trazem muitas variáveis que podem agir sobre os resultados: comprimento de onda, fluência, potencia, densidade de potencia, energia por ponto, energia total, técnica de aplicação, quantidade de pontos irradiados e localização dos pontos. Aqui, nosso interesse foi investigar o efeito de diferentes fluências, 30J/cm² e 40J/cm² dos lasers 660nm e 780nm sobre a angiogenese.

Embora o retalho cutâneo seja bastante utilizado na prática cirúrgica ainda persiste o problema da perda do tecido por necrose devido à isquemia. Neste trabalho, pode-se observar que no modelo de retalho cutâneo randômico ocorre um processo inflamatório em resposta a

hipóxia, com um aumento da expressão do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 alpha), aumento do número de vasos, atividade de MMP-2, e extensa área de necrose (dados não mostrados). Visto que esses fatores estão envolvidos no processo de angiogênese, analisou-se o efeito do laser 660nm, 780nm sobre esses marcadores.

Os dados mostraram que o laser 660nm na fluência de $40\text{J}/\text{cm}^2$ modulou a expressão de HIF-1 α , atividade de MMP-2 e contribuiu para o aumento do número de vasos quando comparado ao grupo não tratado. Outros autores também investigaram os efeitos do laser no comprimento de onda do vermelho sobre a viabilidade do retalho cutâneo, estes trabalhos mostraram efeitos positivos. Amir¹² e Bossini *et al.*¹⁵, utilizando respectivamente, o laser 670nm com fluência de $24\text{J}/\text{cm}^2$ e 632,8nm com fluência de $2,9\text{J}/\text{cm}^2$, mostraram aumento do número de vasos e consequente redução da área de necrose após o tratamento.

O estudo dos marcadores angiogênicos mostrou que tanto a fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$ quanto a de $40\text{J}/\text{cm}^2$ no comprimento de onda de 780nm, foram capazes de modular a atividade da MMP-2 e aumentaram o número de vasos quando comparados ao controle. A expressão de HIF-1 α aumentou apenas na fluência de $40\text{J}/\text{cm}^2$. O laser infravermelho também exerceu um efeito positivo sobre a viabilidade do retalho cutâneo, aumentando o fluxo sanguíneo^{9,11,17}, e reduzindo a área de necrose^{9,16,20}.

Os comprimentos de onda curtos dispersam mais e penetram menos profundamente no tecido do que os comprimentos de onda longos. Portanto comprimentos de onda curtos, no intervalo do visível, podem ser mais apropriados para o tratamento de lesões superficiais e comprimentos de onda longos no intervalo do infravermelho próximo podem ser mais úteis para tratamento de lesões profundas²³. Como diferentes comprimentos de onda exercem diferentes efeitos sobre o tecido, decidimos comparar o laser vermelho com o infravermelho. Os resultados mostraram que em relação ao controle a fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$ do laser

infravermelho modulou a atividade da MMP-2 e aumentou o número de vasos. Quanto à fluência de $40\text{J}/\text{cm}^2$, em relação ao controle tanto vermelho quanto infravermelho foram capazes de modular HIF-1 α e MMP-2 e aumentar o número de vasos. Prado *et al.*¹⁶ e Assis *et al.*²⁰ avaliaram os efeitos dos *lasers* vermelho e infravermelho sobre a viabilidade do retalho cutâneo, no entanto não observaram diferença entre os *lasers*.

A angiogênese é um processo regulado por uma grande quantidade de fatores de crescimento e vias de sinalização²⁴. Esse processo é essencial durante a embriogênese e também em inúmeras patologias envolvendo um novo crescimento tecidual. A angiogênese pode ser estimulada por uma redução fisiológica do oxigênio ou por hipóxia²⁵.

Foi mostrado que a hipóxia induz liberação de citocinas (VEGF, TGF- β , PDGF), para estimular a proliferação e migração de fibroblastos e queratinócitos. Respostas celulares adaptativas à hipóxia são mediadas pelo fator induzível por hipóxia (HIF-1), um fator de transcrição que forma um complexo heterodimérico de duas proteínas *helix-loop-helix* PAS; HIF-1 β ou ARNT (aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator) que é constitutivamente expresso, e HIF-1 α que é induzido pela situações de hipóxia e é rapidamente degradado sob condições de normoxia pelo sistema ubiquitina–proteasoma. Esta via proteolítica é inibida em condições de hipóxia, resultando em acúmulo de proteínas HIF-1 α e ativação de genes importantes para a adaptação e sobrevivência em condições de hipóxia^{26,27}. HIF-1 tem um papel fundamental na cicatrização de feridas, e é expresso em vários estágios no processo normal de cicatrização^{28,29}

Os resultados encontrados mostraram que o laser de $40\text{J}/\text{cm}^2$ vermelho e infravermelho aumentaram a expressão de HIF-1 α , mas não nos grupos controle nem nos irradiados com uma fluência menor. Esses resultados sugerem que com a maior fluência podemos aumentar a

expressão de HIF-1 α , necessário para a expressão de múltiplos fatores de crescimento angiogênicos, motilidade celular, e recrutamento de células progenitoras endoteliais²⁸.

Evidências sugerem que o processo redox está provavelmente envolvido no mecanismo pelo qual células sentem uma queda do oxigênio e iniciam uma resposta. O tratamento de células com peróxido de hidrogênio reduziu a formação de HIF-1 α e a expressão do RNAm da Epo (eritropoietina) em resposta a hipóxia. Visto que a formação de radicais de oxigênio e de superóxidos são dependentes da disponibilidade de oxigênio, sua redução sob condições de hipóxia poderia servir como um sinal inicial na sensibilidade por oxigênio, levando a um aumento de HIF-1 α ³⁰.

Em contraste outro autor expõe que o aumento de espécies reativas de oxigênio devido a hipóxia é necessário para a formação e estabilização de HIF-1 α , contudo este não diminuiria na presença de espécies reativas³¹.

A primeira causa da ação patogênica de espécies reativas em excesso é a liberação de ferro ferroso livre, que é aparentemente ausente nos tecidos, mas presente nas células na forma de ferritina. Reduzido em um íon ferroso livre estes íons podem formar radicais livres interagindo com peróxido de hidrogênio, hipoclorito e hidroperóxidos lipídicos resultando na formação de radicais hidroxila, o que são altamente reativos. Sua interação com proteínas traz a sua desnaturação e sua reação com ácidos nucléico é acompanhada por efeitos mutagênicos e letais³².

Os mecanismos biológicos de ação do laser são ainda muito debatidos. Sabe-se que de forma a interagir com a célula viva, a luz deve ser absorvida por cromóforos intracelulares da membrana. A superóxido dismutase (SOD) é um provável fotoceptor da radiação laser³³. A SOD reduz a concentração do radical superóxido, catalisando a reação da dismutação, protegendo os tecidos. Como resultado a concentração de superóxido estacionária diminui.

Considerando que a diminuição de radicais de oxigênio e de superóxidos levaria a um aumento de HIF-1 α , o aumento desses radicais e superóxidos seria um estímulo para diminuição da expressão de HIF-1 α . Como o laser é capaz de fotorreativar a SOD reduzindo a concentração do radical superóxido, podemos sugerir que o laser de 40J/cm² aumentou a expressão de HIF-1 α devido à diminuição da formação de radicais superóxidos, diminuindo a toxicidade desse radical nas células e nos tecidos, mantendo os sinais para expressão de genes importantes na angiogênese.

Em seus estudos Prado *et al.*¹⁶, mediu a concentração de malondialdeído (MDA) que dá indícios da presença e atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ele comparou 2 comprimentos de onda (670nm e 830nm), e observou que apenas o grupo irradiado com o comprimento de onda 670nm, apresentou uma diminuição nos níveis de MDA em relação ao controle. Sendo o laser efetivo na redução da concentração de MDA e indiretamente de espécies reativas.

Karu³⁴ evidenciou que a irradiação de mitocôndria de ratos nos comprimentos 650nm, 632,8nm e 600nm, aumentaram a síntese de ATP, enquanto que a irradiação com 760nm diminuiu a síntese de ATP em ratos. Também reporta que baixas doses regulam e aceleram o transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocôndrial, enquanto que em doses elevadas ocorre declínio da síntese de ATP, inibição da respiração, diminuição do potencial de membrana.

A angiogênese é um processo no qual novos vasos emergem de um vaso endotelial existente. É um processo invasivo que requer degradação da matriz extracelular por metaloproteinases de matriz (MMPs) oferecendo espaço no qual as células endoteliais podem migrar e liberar fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento tipo-insulina

(IGF). As MMPs são uma família de endopeptidases que seletivamente degradam componentes da matrix extracelular. Elas são produzidas por uma variedade de células, como células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias, e estão claramente implicadas na angiogênese^{35,36}.

Tem sido demonstrado que o VEGF; gene responsivo a hipóxia regulado pelo HIF-1, pode induzir a produção de MMP-2 em células endoteliais da derme humana³⁷. Os estudos realizados demonstraram um aumento da MMP-2 nos grupos V40, IV 30, IV 40, comparado com o controle, mas só observamos diferença entre as fluências ($30\text{J}/\text{cm}^2$ e $40\text{J}/\text{cm}^2$) nos grupo irradiado com infravermelho.

Essas divergências entre os resultados do vermelho e do infravermelho nas fluências utilizadas podem ser pelo fato de que mudanças morfológicas cheguem a um platô. Stetler-Stevenson³⁵ tratou células endoteliais com pro-MMP-2 e induziu mudanças morfológicas dose-dependente na resposta angiogênica (formação de tubos). No entanto quando esse efeito chegou a um platô a MMP-2 iniciou a reversão da formação dos tubos.

As análises aqui apresentadas mostraram que houve um aumento de vasos principalmente no grupo irradiado com 780nm ($40\text{J}/\text{cm}^2$), onde foi observada a maior atividade de MMP-2 e HIF-1 α , no entanto esse tendência não foi seguida pelos outros grupos já que os ratos irradiados com 660nm ($40\text{J}/\text{cm}^2$) apresentaram aumento de vasos mas não de MMP-2. Um provável motivo para esse acontecimento é o a fato de que inibição da atividade da MMP também é necessária para a estabilização dos vasos durante a fase de resolução de angiogênese³⁶.

Yan *et al.*² observou que o aumento de micro vasos no terceiro dia pós operatório de ratos submetidos a retalho cutâneo randômico tratados com ondas de choque extra corporal, apresentavam uma camada de endotélio, não sendo suficiente para aumentar o fluxo

sanguíneo. Ele demonstrou a importância da vasodilatação no pós-operatório imediato dos vasos pré-existentes, para aumentar a sobrevivência do retalho, já que a neovascularização ocorreu em uma fase final de seu tratamento.

O aumento do número de vasos nos grupos irradiados com laser no nosso estudo não foi suficiente para aumentar a viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. No entanto, não foi medido o diâmetro dos vasos e estes podem não ser maduros o bastante para aumentar a perfusão sanguínea não sendo suficiente para aumentar a sobrevivência do retalho. Além disso o presente estudo não apresentou diminuição do HIF-1 α em nenhum animal comparado com o controle, mostrando que o tecido permaneceu em hipóxia apesar do tratamento.

A perfusão sanguínea importante para a sobrevivência do retalho também está relacionada com os mecanismos do NO na vasodilatação³⁸. Fibroblastos dérmicos humanos produzem NO, tanto pela isoforma constitutiva eNOS quanto a isoforma induzida iNOS. A indução de NOS é aumentada durante a cicatrização normal de feridas e é expressa por fibroblastos e macrófagos. A deficiência na formação de NOS por fibroblastos causa diminuição da proliferação da síntese de colágeno, e diminuição de sua propriedade contrátil³⁹. No entanto este trabalho não apresentou diferença na dosagem de NO, provavelmente por se tratar de uma medida tardia.

Os efeitos aqui apresentados mostram que o laser modulou atividade de MMP-2, expressão de HIF-1 α e aumentou o número de vasos, contudo esses efeitos não foram suficientes para aumentar a viabilidade dos retalhos e mostraram através do HIF-1 α que os animais dos grupos irradiados com 40J/cm², apresentaram mais hipóxia que os outros grupos mesmo apresentando mais vasos e MMP-2 com relação ao controle.

Fica difícil estabelecer uma relação deste trabalho com os outros estudos sobre laser e viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos, visto que são poucos os trabalhos que

avaliaram contagem dos vasos sanguíneos, ou fluxo sanguíneo^{9,11,12,15,17} sendo que a uma grande parte das pesquisas se fixaram na avaliação da área de necrose.

CONCLUSÃO

Esses dados mostram a importância das pesquisas com laser, a fim de validar sua correta utilização. Embora os *lasers* vermelho e infravermelho, nessas fluências não surtam efeitos positivos sobre a viabilidade do retalho cutâneo, poderiam ser utilizados em tratamentos onde se requer a indução de hipóxia.

REFERÊNCIAS

- 1- Ferreira LM. Retalhos Cutâneos. In: Ferreira LM. Manual de cirurgia plástica. São Paulo: Ed. Atheneu, 1995; 45-62.
- 2- Yan X, Zeng B, Chai Y, Luo C, Li X, Improvement of blood Flow, Expression of Nitric Oxide, and Vascular Endothelial growth Factor by Low-Energy Shockwave Therapy in Random-Pattern Skin Flap Model. *Ann Plast Surg.* 2008 Dec; 61(6): 646-53.
- 3- Biondo-Simões MLP, Greca FH, Paula JB, Chin EWK, Santos EAA, Stalhschmidt FL. Influência do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos – estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.* 2000, 15 (3): 36-40.
- 4- Tyner TR, Tong W, Donovan K, McDonald T, Sian K, Yamaguchi KT, Dichloroacetate reduces tissue necrosis in a rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model. *Ann Plast Surg.* 2006 Mar; 56 (3):320-6.
- 5- Niina Y, Ikeda K, Iwa M, Sakita M. Effects of electroacupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation on survival of musculocutaneous flap in rats. *Am. J. Chin. Med.* 1997; 25: 273-80.
- 6- Im MJ, Lee WPA, Hoopes JE. Effect of electrical stimulation on survival of skin flap in pigs. *Phys. Ther.* 1990; 70 (1): 37-40.
- 7- Kjartansson J, Lundeborg T. Effects of electrical nerve stimulation (ENS) in ischemic tissue. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg,* 1990; 24:129-134.
- 8- Liebano RE, Ferreira LM, Sabino NM. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Can. J. Plast. Surg.* 2002; 10: 151-4.

- 9- Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Ohshiro T, Fujino T. Effects of low-power diode lasers on flap survival. *Ann. Plast. Surg.* 1985; 14 (3): 278-83.
- 10- Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plast. Reconstr. Surg.* 1992; 89 (2): 306-10.
- 11- Kubota J, Ohshiro T. The effects of diode laser LLLT on flap survival: measurement of flap microcirculation with laser speckle flowmetry. *Laser Ther.* 1996; 8:241-6.
- 12- Amir A, Solomon AS, Giler S, Cordoba M, Hauben DJ. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br. J. Plast. Surg.* 2000; 53, 58-62.
- 13- Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg. Med.* 2005; 37: 74-7.
- 14- Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Diode laser in viability of random skin flap in rats. *Photomed. Laser Surg.* 2005; 23 (1): 115.
- 15- Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci.* 2008 Mar; 24(2): 209-13.
- 16- Prado R, Neves L, Marcolino A, Ribeiro T, Pinfildi C, Ferreira L, Thomazini J, Piccinato C. Effect of Low-Level Laser Therapy on Malondialdehyde Concentration in Random Cutaneous Flap Viability. *Photomed Laser Surg.* 2009 Oct 30.
- 17- Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med. Sci.* 2002; 17:146-53.
- 18- Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile RR, Messina A, Wagh M, Fraulin FOG, Morrison WA, Stewart AG Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol.* 2001 Apr; 132(8):1631-8.
- 19- Baldan C. Ação do laser vermelho de baixa potência na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. São Paulo, 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 20- Assis LR, Marcolino A, Pinfildi CE, Prado RP, Lourencin F, Ferreira LM. Comparação dos lasers diodo 904nm e 670nm na viabilidade do retalho cutâneo randomico isquemico em ratos. *Fisioterapia Brasil.* 2008; 7 (1): 36 - 39.
- 21- Zhang D, Zhou Y, Xiao B, Li G. The effect of postoperative irradiation with low incident levels of CO₂ laser irradiation on skin flap survival and the possible mechanisms. *Laser Ther.* 1992; 4:75-9.
- 22- National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1996.

- 23- Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizotto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisioterapia Brasil*. 2001; 2 (4): 221-40.
- 24- Hamik A, Wang B, Jain MK, Transcriptional Regulators of Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006, 26:1936-1947.
- 25- Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, Ferrara N, Johnson R. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia – driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004 Nov;6(5):485-95.
- 26- Hoeben A, Landuyt B, Highley Ms, Wildiers H, Oosterom ATV, Bruijn EA. Vascular endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Reviews*. 2004 Dec; 56(4):549-80.
- 27- Milkiewicz M, Haas TL. Effect of mechanical stretch on HIF – 1 α and MMP – 2 expression in capillaries isolated from overloaded skeletal muscles: laser capture microdissection study. *Heart Circ Physiology*. 2005 Sep; 289 (3): H 1315-20.
- 28- Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, Pereira T, YLA – Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, CATRINA SB. Stabilization of HIF -1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19426-31.
- 29- Srinivas V, Zhu X, Salceda S, Nakamura R, Caro J, Hypoxia – inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Is a Non-heme Iron Protein. *The Journal of biological Chemistry*. 1998 Jul 17; 273(29) : 18019-22.
- 30- Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5; 272 (36):22642-7.
- 31- Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL Jr, Reichner JS. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Dec; 281(6):C1971-7.
- 32- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry*. 2004 Jan; 69(1):81-90.
- 33- Ferreira MC, Gameiro J, Nagib PR, Brito VN, Vasconcelos Eda C, Verinaud L. Effect of low intensity helium-neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidiodomycotic wound healing dynamics. *Photochem Photobiol*. 2009 Jan-Feb;85(1):227-33.
- 34- Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quant. Electr*. 1987; 23 (10): 1703-17.
- 35- Stetler-Stevenson WG, Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*. 1999; 103(9):1237-41.
- 36- Heissing B., Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z, Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Current Opinion in Hematology*, 2003 Mar;10(2):136-41.

37- Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, Goldstein J, Brown MD, Egginton S, Hansen FM, Hudlicka O, Haas TL. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch-versus shear stress-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Oct; 283(4):H1430-8.

38- Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, Kim BM, Tanaka T, Hiai H, Nishimura Y. Involvement of Nitric Oxide in Survival of Random Pattern Skin Flap. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Mar; 101(3) : 785-92.

39- Burrow JW, Koch JA, Chuang H, Zhong W, Dean DD, Sylvia VL, Nitric Oxide Donors Selectively Reduce the Expression of Matrix metalloproteinases-8 and -9 by Human Diabetic Skin Fibroblasts. *J Surg Res.* 2007 Jun 1;140(1):90-8.

PARTE III

Considerações Finais

Referências Bibliográficas

4. CONCLUSÕES FINAIS

Os *lasers* vermelho (660nm) e infravermelho (780nm) afetam a cicatrização tecidual quando utilizados nas fluências de 30J/cm² e 40J/cm² em retalho cutâneo randômico de ratos. Os efeitos do lasers são dose-dependentes, uma vez que, na fluência de 40J/cm² exerceu maior influência sobre os parâmetros analisados (número de vasos, atividade de MMP-2 e expressão de HIF-1 α). Neste modelo, os comprimentos de onda utilizados induziram hipóxia tecidual e inviabilizaram o retalho cutâneo. Esse trabalho nos permitiu avaliar alguns dos mecanismos moleculares modulados pela laserterapia. Vimos aqui, que o laser promove a angiogênese pela indução do fator de transcrição HIF-1 α . Embora os lasers vermelho e infravermelho, nas fluências utilizadas não tenham mostrado efeitos positivos sobre a viabilidade do retalho cutâneo, poderiam ser utilizados em tratamentos onde a indução de hipóxia seria desejada. Esses dados evidenciam a importância das pesquisas com laser, a fim de validar sua correta utilização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINA, J.E.; MASTROFRANCESCO, B.; VESSELLA, J.A.; LOUIS, C.A.; HENRY W.L. JR.; REICHNER, J.S. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α . **Am. J. Physiol .Cell. Physiol.**, v. 281, n. 6, p. 1971-7, 2001.

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

ASSIS, L.R.; MARCOLINO, A.; PINFILDI, C.E.; PRADO, R.P.; LOURENCIN, F.; FERREIRA, L.M. Comparação dos lasers diodo 904nm e 670nm na viabilidade do retalho cutâneo randomico isquêmico em ratos. **Fisioterapia Brasil**, v. 7, n 1, p. 36 – 39, 2008.

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

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

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

BOSSINI, P.S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R.M.; RENNO, A.C.; BENZE, B.; ZUANON, J.A.; NETO, C.B.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers Med. Sci.**, v.24 p. 209-13, 2008.

BOTUSAN, I.R.; SUNKARI, V.G.; SAVU, O.; CATRINA, A.I.; GRUNLER, J.; LINDBERG, S.; PEREIRA, T.; YLA – HERTTUALA, S.; POELLINGER, L.; BRISMAR, K.; CATRINA, S.B. Stabilization of HIF -1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105(49), p. 19426-31, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248- 254, 1976.

BURROW, J.W.; KOCH, J.A.; CHUANG, H.; ZHONG, W.; DEAN, D.D.; SYLVIA, V.L. Nitric Oxide Donors Selectively Reduce the Expression of Matrix metalloproteinases-8 and -9 by Human Diabetic Skin Fibroblasts. **J. Surg. Res.**, v.140, p. 90-98, 2007.

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

COOMBE, A. R.; HO, C.; PHILIPS J.R. CHAPPLE, C.C. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin. Orthod.**, p. 3-14, 2006.

CONWAY EM., COLLEN D., CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 507–521, 2001.

CORAZZA, A.V; JORGE, J.; KURACHI, C., BAGNATO, V. Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources. **Photomed. Laser Surg.**, 25: 102–106, 2007.

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

DUARTE, S.I.; GOMES, H.F.C.; FERREIRA, L.M. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. **Can. J. Plast. Surg.**, v. 6, p. 93-97, 1998.

DEMIDOVA-RICE, T.; SALOMATINA, E.V.; YAROSLAVSKY, A.N.; HERMAN, I.; HAMBLIN, R. Low-Level Light Stimulates Excisional Wound Healing in Mice **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 706–715, 2007.

ESTEVES JUNIOR, I.; FERREIRA, L.M.; LIEBANO, R.E. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Brás.**, v. 19, n. 6, p. 626-629, 2004.

ENWEMEKA, C.S.; CONHEN-KORNBERG, E.; DUSWALT, E.P.; WEBER, D.M.; RODRIGUEZ, I.M. Biomechanical effects of three different periods of GaAs laser photostimulation on tenotomized tendons. **Laser Ther.**, v. 6, p. 181-188, 1994.

FAN, T.D., JAGGAR, R. & BICKNELL, R. Controlling the vasculature-angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular target- ing of gene therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p. 57-66, 1995.

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

FERREIRA, M.C.; GAMEIRO, J.; NAGIB, P.R.; BRITO, V.N.; VASCONCELLOS, E. C.; VERINAUD, L. Effect of low intensity helium-neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, p. 227-33, 2009.

GABORIAU, H. P.; MURAKAMI, C. S. Skin anatomy and Flap physiology. **Otolaryngologic clinics of north america**, v. 34 n. 3, 2001.

HAMIK, A.; WANG, B.; JAIN, M.K.; Transcriptional Regulators of Angiogenesis. Arteriosclerosis, **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, p. 1936-1947, 2006.

HART. K; BAUR, D.; HODAM, J.; LESOON-WOOD, L.; PARHAM, M.; KEITH, K.; VAZQUEZ, R.; AGER, E.; PIZARRO, J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. **Laryngoscope**, v. 116, p. 522-8, 2006.

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; OOSTEROM, A.T.V.; BRUIJN, E. A. Vascular endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacol. Reviews.**, v. 56, n. 4, p. 549-80, 2004.

HOFELING, A.D.; BELLO, G.; JACKSON, I.; JACKSON, A.H.; KIM E. Hemoglobin-based oxygen carrier does not improve survival of ischemic rat island groin flaps. **J. Invest. Surg.**, v. 19, p. 299-305, 2006.

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

JURELL, G.; JONSSON, C.E. Increased survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 10, p. 169-172, 1976.

KANE, A.J.; BARKER, J.E.; MITCHELL, G.M.; THEILE, R.R.; MESSINA, A.; WAGH, M.; FRAULIN, F.O.G.; MORRISON, W.A.; STEWART, A.G. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, n. 8, p. 1631-8, 2001.

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

KAMI T. The experimental effect of low-energy laser on skin flap survival. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 90, p. 1127-8, 1992.

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

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

KERRIGAN, C.L. Skin Flap Failure: Pathophysiology. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 72, p. 766-777, 1983.

KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M.H.; SHANKAR, L.R.; KHANNA L.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.28, p. 355-364, 2001.

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

KORLOF, B.; UGLAND, O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with Complamin and with Dicoumarol: animal experiments. **Acta Chir. Scand.**, v. 131, n. 5, p. 408-412, 1966.

KREISLER, M.; AL HAJ, H. Temperature changes induced by 809 nm GaAlAs laser at the implant-bone interface during simulated surface decontamination. **Clin. Oral Implant Research**, v. 14, p. 91-6, 2003.

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

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

LIEBANO, R.E.; FERREIRA, L.M.; SABINO NETO, M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. **Can. J. Plast. Surg.**, v. 10, p. 151-154, 2002.

LI, J.; ZHANG, Y-P.; KIRSNER, R.S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy Res. Technique**, v. 60, p. 107-14, 2003

LUNDEBERG, T.; MALM, M. Low- Power HeNe Laser Treatments of Venous Leg Ulcers. **Annals of Plastic Surgery**, v. 26, n.6, 1991.

McFARLANE, R.M.; DeYOUNG, G.; HENRY, R.A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 35, n. 2, p. 177-182, 1965.

MITTERMAYR, R.; OSIPOV, A.; PISKERNIK, C.; HAINDL, S.; DUNGEL, P.; WEBER, C.; VLADIMIROV, Y.A.; REDL, H.; KOZLOV, A.V. Blue Laser Light Increases Perfusion of a Skin Flap Via Release of Nitric Oxide from Hemoglobin. **Mol. Med.**, v. 13, p. 22 - 29, 2007.

MILKIEWICZ, M.; HAAS, T.L.; Effect of mechanical stretch on HIF - 1 α and MMP - 2 expression in capillaries isolated from overloaded skeletal muscles: laser capture microdissection study. **Heart Circ. Physiology**, v. 289, p. H 1315-20, 2005.

MEIRELES, G.; SANTOS, J.N.; CHAGAS, P.; MOURA, P.; PINHEIRO, A.L.B. Effectiveness of Laser Photobiomodulation at 660 or 780 Nanometers on the Repair of Third-Degree Burns in Diabetic Rats. **Photomedicine Laser Surg.**, v. 26 p. 47-54, 2008.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109, 1991.

MOORE, P.; RIDGWAY, T.D.; HIGBEE, R.G.; HOWARD, E.W.; LUCROY, M.D. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC, USA: **National Academy Press**, 1996.

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

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S. dos; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.

PINFILDI, C.E.; LIEBANO, R.E.; HOCHMAN, B.S.; FERREIRA, L.M. Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 37, p. 74-77, 2005.

PINHEIRO, A.L.; CARNEIRO, N.S.; VIEIRA, A.L.; BRUGNERA, A. JR.; ZANIN, F.A.; BARROS, R.A.; SILVA, P.S. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, p. 23-6, 2002.

POSTEN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S.; ARNDT, K.A.; SILAPUNT, S.; ALAM M. Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.**, v. 33, p. 334–340, 2005.

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

PRADO, R.; NEVES, L.; MARCOLINO, A.; RIBEIRO, T.; PINFILDI, C.; FERREIRA, L.; THOMAZINI, J.; PICCINATO, C. Effect of Low-Level Laser Therapy on Malondialdehyde Concentration in Random Cutaneous Flap Viability. **Photomed. Laser Surg.**, 2009.

RENNO, A.C.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, p. 275-80, 2007.

RIVILIS, I.; MILKIEWICZ, M.; BOYD, P.; GOLDSTEIN, J.; BROWN, M.D.; EGGINTON, S.; HANSEN, F.M.; HUDLICKA, O.; HAAS, T.L. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 4, p. H1430-8, 2002.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 267 – 285, 2005.

SALATE, A.C.B.; BARBOSA, G.; GASPAR, P.; CARRINHO, P.; KOEKE, P.; PARIZOTTO, N.. Effect of In-Ga-Al-P Diode Laser Irradiation on Angiogenesis in Partial Ruptures of Achilles Tendon in Rats. **Photomedicine Laser Surg.**, v. 23, p. 470–475, 2005.

SALCEDA S, CARO J. Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 36, p. 22642-7, 1997.

SASAKI, G.H.; PANG, C.Y. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 65, p. 152-158, 1980.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L.; JURECKA, W.; HÖNIGSMANN, H.; BREIER, F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic

radiation ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 40, n. 3, p. 481-484, 1999.

SKINNER, S.M.; GAGE, J.P.; WILCE, P.A.; SHAW, R.M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust. Dent. J.**, v. 41, p.188–192, 1996.

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

SRINIVAS, V.; ZHU, X.; SALCEDA, S.; NAKAMURA, R.; CARO, J.; Hypoxia – inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Is a Non-heme Iron Protein. **The Journal of biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18019-22, 1998.

STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 9, p. 1237-41, 1999.

TANG, N.; WANG, L.; ESKO, J.; GIORDANO, F.J.; HUANG, Y.; GERBER, H.P.; FERRARA, N.; JOHNSON, R. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia – driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. **Cancer Cell.**, v. 6, n. 5, p. 485-95, 2004.

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

UM, S.C.; SUZUKI, S.; TOYOKUNI, S.; KIM, B.M.; TANAKA, T.; HIAI, H.; NISHIMURA, Y. Involvement of Nitric Oxide in Survival of Random Pattern Skin Flap. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 101, n. 3, p. 785-92, 1998.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Gene. Dev.**, v. 14, p. 2123-2133, 2000.

WERNECK, C.E.; PINHEIRO, A. L.; PACHECO, M.T.; SOARES, C.P. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomedicine Laser Surg.**, v. 23, p. 300-3, 2005.

WILDEN, L.; KARTHEIN R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 16, p.159-165, 1998.

YAN, X.; ZENG, B.; CHAI, Y.; LUO, C.; LI, X. Improvement of blood Flow, Expression of Nitric Oxide, and Vascular Endothelial growth Factor by Low-Energy Shockwave Therapy in Random-Pattern Skin Flap Model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 61, n. 6, p. 646-53, 2008.

ZHANG, D.; ZHOU, Y.; XIAO, B.; LI, G. The effect of postoperative irradiation with low incident levels of CO₂ laser irradiation on skin flap survival and the possible mechanisms. **Laser Ther.**, v. 4, p. 75-9, 1992.

6. ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com animais.



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

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal n.º 10/2008

Protocolo n.º 013/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 19ª. Reunião, ocorrida em 15/04/2008, **APROVOU** o trabalho intitulado “Laser Vermelho e Infravermelho em diferentes Dosimetrias na viabilidade do Retalho Cutâneo em Ratos”, elaborado por Nivaldo Antonio Parizotto.

São Carlos, 15 de abril de 2008.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal