

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
DIRETORIA DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

ALEXANDRE JIN BOK AUDI CHANG

SÃO PAULO
2021

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO INTRA OPERATÓRIA NO PEDÍCULO DE RETALHOS CUTÂNEOS DE CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aluno: Alexandre Jin Bok Audi Chang
Orientador: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

SÃO PAULO
2021

Chang, Alexandre Jin Bok Audi.

Efeitos da Fotobiomodulação intra operatória nos pedículos de retalhos cutâneos de camundongos. / Alexandre Jin Bok Audi Chang. 2021.

54 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Stella Regina Zamuner.

Fotobiomodulação. 2. Laser de baixa de intensidade. 3. Retalhos cirúrgicos. 4. Necrose.

Zamuner, Stella Regina. II.

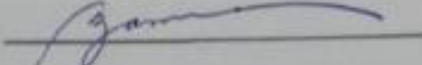


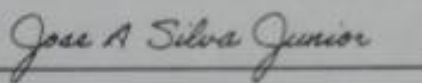
São Paulo 14 de junho de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

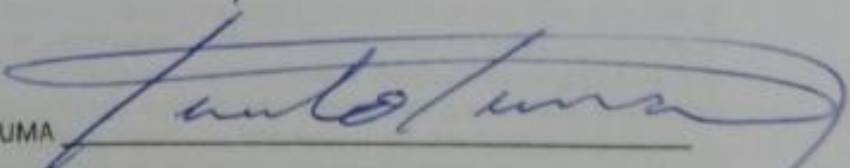
Aluno: ALEXANDRE JIN BOK AUDI CHANG

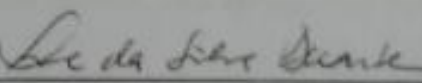
Titulo da tese: "EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO INTRA OPERATÓRIA NO PEDÍCULO DE RETALHOS CUTÂNEOS DE CAMUNDONGOS".

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER 

Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR 

Membro: PROFA. DRA. CHRISTIANE PAVANI 

Membro: PROF. DR. PAULO TUMA 

Membro: PROFA. DRA. IVONE DA SILVA DUARTE 

DEDICO

Aos meus pais, Sandra e Chang (In memoriam), que me deram a vida,

Ao meu padrasto Edgard que me impôs força e coragem para vivê-la em plenitude;

À minhas irmãs Andréa e Angélica, minhas eternas cúmplices e conselheiras;

À minha noiva Marília, que compartilha sua leveza e alegria à nossa jornada.

AGRADEÇO

À minha orientadora, professora Stella Regina Zamuner, por acreditar neste projeto, pelos ensinamentos e pelo meu crescimento pessoal neste curso;

Ao meu mestre, professor Paulo Tuma Junior, muito além de professor, é uma inspiração profissional desde o início da minha formação;

Ao professor José Antonio Silva Junior, pelas sugestões iniciais ao projeto e à tese tanto na primeira quanto na segunda qualificação;

À professora Maria Cristina Chavantes, pelas sugestões ao projeto na primeira qualificação;

Ao aluno de iniciação científica, Deiwet Ribeiro Silva, que tanto me auxiliou, na realização das cirurgias, no cuidado diário aos animais e nos preparos histológicos;

À doutora Luciana Miato Gonçalves Dias, pelo auxílio nas análises de interleucinas por Elisa;

À aluna de mestrado Amanda Cabral David pelo auxílio no texto do trabalho;

Ao revisor Francisco Savoi pela revisão do texto e da formatação;

Aos animais de experimentação, sem eles nada disso seria possível;

À Universidade Nove de Julho pela oportunidade e infraestrutura para a realização deste projeto.

RESUMO

A perda de retalhos cutâneos (RC) por necrose tecidual constitui-se em grave complicação, podendo cursar com mortalidade. Esse desfecho ocorre entre 2 a 20% dos procedimentos realizados. A principal causa é a hipoperfusão tecidual aliada à lesão de isquemia-reperfusão. Não existe na atualidade, tratamento adjuvante que melhore a sobrevivência de retalhos cutâneos, sem efeitos colaterais ou riscos significativos. Estudos recentes buscam provar a eficiência da fotobiomodulação, como terapia adjuvante, que apresenta resultados promissores para o aumento da sobrevivência dos RCs. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fotobiomodulação sobre retalhos cutâneos dorsais de camundongos. Neste trabalho foram utilizados 48 camundongos machos adultos (Balb/C, 20 – 25g), divididos em dois grandes grupos: Controle (n=24) e Experimento (n=24). Foram elevados os retalhos cutâneos no dorso dos animais de ambos os grupos e submetidos à irradiação com laser de baixa intensidade no grupo Experimento. No grupo Controle houve apenas a simulação da aplicação. A fotobiomodulação no pedículo do retalho teve comprimento de onda de 660 nm, exposição radiante de 2 J/cm² por um tempo total de 20 segundos em varredura, no pedículo vascular interno do retalho. Após o tratamento, os animais foram separados em 3 subgrupos (conforme o dia da eutanásia) contendo 8 animais cada um, dentro dos respectivos grupos Controle e Experimento. Os animais foram eutanasiados no 4^o, 7^o e 10^o dia pós-operatório. Foi analisada a porcentagem de necrose tecidual nos retalhos, as dosagens de interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), além do Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa). Ainda, foram realizadas análises histológicas dos retalhos para avaliação do número de células inflamatórias e grau de destruição tecidual isquêmica. Os resultados demonstraram que a fotobiomodulação reduziu a área de necrose distal dos retalhos, diminuiu significativamente as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , houve redução significativa do número de células inflamatórias, do grau de destruição tecidual e aumento da citocina IL-10 nos grupos submetidos à fotobiomodulação em comparação com os grupos Controle. A fotobiomodulação pode melhorar a sobrevivência de retalhos cutâneos por diminuir a inflamação, tanto pela redução de células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias quanto por aumentar uma citocina endógena anti-inflamatória, a IL-10.

Palavras-Chave: fotobiomodulação, laser de baixa de intensidade, retalhos cirúrgicos, necrose.

ABSTRACT

The loss of skin flaps (CR) due to tissue necrosis can be catastrophic and may potentially cause death. This outcome occurs between 2 to 20% of the procedures performed. The main cause is tissue hypoperfusion combined with ischemia-reperfusion injury. Currently, there is no adjuvant treatment that improves skin flaps survival, without side effects or risks. Recent studies seek to prove the efficiency of Low Level Laser Therapy (LLLT), as an adjuvant therapy, and show promising results for increasing the survival of CRs. The objective of this study was to evaluate the effect of fotobiomodulação on dorsal skin flaps in mice. In this study we used 48 adult male mice (Balb / C, 20 - 25g), divided into two groups: Control (n = 24) and Experiment (n = 24). Skin flaps were raised on the backs of animals in both groups and submitted the flaps to low-level laser irradiation in the Experiment group. In the Control group, there was only a simulation of the application. The LLLT was applied at the internal pedicle of the flap with a wavelength of 660 nm, radiant exposure of 2 J / cm² for a total time of 20 seconds in the interior base of the flap as a scan passage, within the flap vascular pedicle. After treatment, animals were separated into 3 subgroups (according to the day of euthanasia) containing 8 animals each Control and Experimental groups. The animals were euthanized on the 4th, 7th and 10th postoperative days. We analyzed the percentage of tissue necrosis in the flaps, such as interleukin levels 1 (IL-1), 6 (IL-6), 10 (IL-10) and the Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha). In addition, flap histological analysis was performed to assess the number of inflammatory cells and the degree of ischemic tissue destruction. The results were that LLLT reduced the flaps distal necrosis, significantly decreased cytokines IL-1, IL-6, TNF- α , inflammatory cells, the degree of tissue destruction and increase the anti inflammatory cytokine IL-10 in the LLLT groups compared to Control groups. LLLT can improve skin flap survival by decreasing inflammation, both by reducing inflammatory cells and inflammatory cytokines and by increasing an endogenous anti-inflammatory cytokine, IL-10.

Keywords: photobiomodulation, low level laser therapy, surgical flaps, necrosis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	FISIOLOGIA DO RETALHO CUTÂNEO	14
3.	PERDA DO RETALHO CUTÂNEO	15
3.1	Lesão Isquemia-Reperusão (LIR)	16
3.2	Inflamação	17
3.3	Denervação Simpática	17
3.4	Angiogênese Deficiente	18
4.	TRATAMENTOS COADJUVANTES	18
5.	LASERTERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)	20
5.1	LBI e Retalhos Cutâneos	23
5.2	LBI e Angiogênese	24
5.3	LBI e protocolos de aplicação	24
6.	JUSTIFICATIVA	26
7.	OBJETIVOS	27
7.1	Geral	27
7.2	Específicos	27
8.	MATERIAL E MÉTODOS	28
8.1	Animais	28
8.2	Técnica Operatória	30
8.3	Análise da Área de Necrose	32
8.4	Análise Histológica de Células Inflamatórias	32
8.5	Análise Histológica da destruição celular	33
9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
10.	RESULTADOS	35
__10.5	Quantificação das concentrações de Interleucina 6 (IL-6)	40
__10.6	Fator de necrose tumoral α (TNF- α)	41
__10.7	Quantificação das concentrações Interleucina 10 (IL-10)	42
11.	DISCUSSÃO	43
12.	CONCLUSÃO	49
13.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
14.	ANEXO - Certificado de aprovação do CEUA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Penetrância dos diferentes comprimentos de onda e faixas de cor.....	19
Figura 2	Mecanismo de ação do LBI.....	20
Figura 3	Técnica cirúrgica padronizada na literatura por Mcfarlane em 1965	29
Figura 4	Cortes Histológicos com a contagem de células inflamatórias	31
Figura 5	Percentuais médios de necrose do grupo controle submetido apenas à elevação do retalho cutâneo (RC) e do grupo RC tratado com a fotobiomodulação.....	33
Figura 6	Fotografia do retalho cutâneo dos animais tratados ou não com o laser.....	34
Figura 7	Efeito do laser de baixa intensidade no escore de destruição celular em cortes de pele na transição pele sadia e necrose.....	35
Figura 8	Efeito do laser de baixa intensidade na quantidade de células inflamatórias em cortes de pele na transição pele sadia e necrose.....	36
Figura 9	Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-1.....	37
Figura 10	Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-6	38
Figura 11	Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de TNF- α	39
Figura 12	Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-10	40

LISTA DE ABREVIATURAS

RC: Retalho Cutâneo

FGF: Fibroblast Growth factor (Fator de Crescimento de Fibroblastos)

VEGF: Vessel endotelial growth factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

LIR: Lesão Isquemia- Reperfusão

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

PGI: Prostraglandina

COX-2: Ciclo-oxigenase -2

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 2

IL-10: Interleucina 10

TNF-alfa: Tumor Necrosis Factor - alfa (Fator de Necrose Tumoral alfa)

1. INTRODUÇÃO

A elevação de retalhos cutâneos (RC) é a base da cirurgia plástica e técnica amplamente utilizada para reconstruir qualquer defeito da pele e de estruturas profundas (FANG et al. 2019). É utilizado após perdas cutâneas, cujas etiologias podem elencar um escopo bem amplo, abrangendo desde infecções até grandes traumas. (ESTEVES et al. 2012; I et al. 2017; LUCAS et al. 2017)

Apesar de ser uma técnica amplamente executada, pode apresentar um resultado desfavorável, que é consequência de um processo isquêmico inerente à sua fisiologia, caracterizado pela necrose tecidual. Tendo em vista esse contexto, a busca por métodos para diminuir a incidência desse desfecho é um importante campo de estudo. (ESTEVES et al. 2012)

Há grupos que buscam tratamentos farmacológicos, porém sem grandes progressos até o momento, uma vez que as drogas utilizadas causam complicações sistêmicas, não desejadas na prática clínica; e há grupos mais inovadores que estudam métodos que não fazem uso de fármacos. (FANG et al. 2019; ZHOU et al. 2016)

Dentre esses grupos que exploram métodos não farmacológicos, os estudos que buscam provar a eficiência da fotobiomodulação, por meio da fotobiomodulação, apresentam resultados promissores, com uma perspectiva importante no aumento da sobrevida dos RCs. (CALIS et al. 2019; DAS NEVES et al. 2017; DUNGEL et al. 2014; KUBOTA 2002; LEITE et al. 2017; MARTIGNAGO et al. 2018; OTTERÇO et al. 2018; PINFILDI et al. 2013; PRADO et al. 2006; ZHOU et al. 2016)

Assim, esse estudo busca ampliar o panorama de conclusões acerca do uso da fotobiomodulação no tratamento de Retalhos Cutâneos, objetivando comprovar a sua eficácia com o aumento da sobrevida dos retalhos, com consequente diminuição da necrose tecidual e melhor desfecho dos procedimentos de reconstrução.

2. FISILOGIA DO RETALHO CUTÂNEO

O transplante de retalhos cutâneos randômicos é utilizado com frequência, sendo amplamente executado nos procedimentos reconstrutivos. É caracterizado, basicamente, como a transferência de uma parcela de tecido cutâneo de uma região à outra, mantendo-se o pedículo vâsculo-nervoso, ou seja, uma base de sua origem, com o objetivo de restabelecer forma e função de áreas corporais que sofreram depleção cutânea. (LUCAS et al 2017; MOON et al. 2018)

O insulto fisiológico mais evidente e complexo que ocorre com a elevação de um retalho cutâneo é a redução significativa do fluxo sanguíneo para a pele envolvida, devido à transecção parcial do suprimento vascular. (LUCAS et al. 2017) Quando o retalho cutâneo está elevado, o fluxo sanguíneo para esse segmento de pele é interrompido. Essa interrupção resulta na queda de pressão de perfusão para pele envolvida, que se reduz cada vez mais à medida que a distância da base do retalho aumenta, reduzindo as pressões de perfusão no retalho. Para isso é realizado um planejamento minucioso a fim de reduzir ao máximo a isquemia distal.

Taylor descreveu o conceito de angiossomo, que afirma que todos os tecidos fazem parte de pequenos territórios vasculares, cada um fornecido por uma artéria principal. Cada tecido de cada território vascular está ligado a territórios vasculares adjacentes através de vasos anastomóticos de calibre reduzido, chamados de *choke vessels*. O comportamento dos *choke vessels* influencia diretamente na sobrevivência dos retalhos. (Taylor GI et al. 1990)

No período imediatamente posterior à elevação de um retalho, o retorno venoso também passa a ser realizado através de uma nova rota de passagem, levando assim a uma expansão drástica do diâmetro e ao aumento da tortuosidade das vênulas comunicantes sem válvulas. As alterações em *choke vessels* têm íntima relação com o microtrauma de cisalhamento causado pela perfusão sanguínea aumentada após a cirurgia. (MAO, YIHUA et al. 2019)

No entanto, as pressões de perfusão na base do pedículo vascular permanecem inalteradas. (ESTEVEZ et al. 2012; LUCAS 2017; ZHOU et al. 2016)

Nesse contexto, o fluxo de nutrientes para os tecidos distais cessa, resultando em necrose na porção distal do retalho, a menos que o fluxo possa ser restabelecido nas áreas com isquemia crítica. Um retalho tolera em média 13 horas de isquemia, antes que a viabilidade do tecido seja irreversivelmente comprometida. (LUCAS et al. 2017)

Em um contexto fisiológico, na presença de isquemia tecidual, ocorre a liberação de fatores de crescimento como Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). (DAS NEVES et al. 2017) Além disso, há estímulos sobre as células endoteliais e células progenitoras endoteliais a fim de que se proliferem e formem novos canais capilares. (DAS NEVES et al. 2017; LEITE et al. 2017; LUCAS et al.2017). O novo crescimento capilar em direção a um estímulo angiogênico ocorre a uma taxa de aproximadamente 0,2 mm por dia, abrangendo distâncias finais de 2 mm a 5 mm. Este processo começa em aproximadamente 3 a 4 dias e é geralmente suficientemente robusto após o sétimo dia. (LUCAS, 2017)

3. PERDA DO RETALHO CUTÂNEO

A perda de retalhos cutâneos é um grande retrocesso na cirurgia, pois além de não corrigir o defeito cutâneo, gera a perda de tecido íntegro proveniente do retalho elevado para aquela reconstrução. (KUBOTA 2002; LUCAS 2017; MOON et al. 2018) Em alguns casos pode representar a última linha de tratamento após grandes perdas cutâneas, secundárias à trauma, neoplasias, infecções, necroses ou outras etiologias. Podendo cursar com óbito se há exposição irreversível de estruturas nobres, como artérias, veias, tecido encefálico, coração, entre outros.

A necrose tecidual pode ocorrer entre 2% a 20% dos procedimentos, dependendo da área em que o retalho é realizado. Além disso, aproximadamente 25% dos retalhos transferidos precisam de revisão por complicações. (BALLESTÍN et al. 2018) Este fato é de grande preocupação para a sociedade médica, uma vez que exigem intervenções cirúrgicas secundárias, podem resultar em infecções, aumentar o tempo de internações e, em uma última consequência, a perda do retalho.(LUCAS, 2017).

Há um número significativo de fatores adicionais que podem impedir a viabilidade do retalho. Estudos mostram que a fisiopatologia da perda dos retalhos é delineada, de forma mais comum, por processos liderados pela lesão isquemia-reperusão e pelo intenso estresse oxidativo.(BALLESTÍN et al. 2018; LUCAS 2017; PRADO et al. 2006) Há outros fatores adicionais, não menos importantes, que devem ser considerados nas alterações do fluxo sanguíneo no retalho cutâneo como os efeitos da denervação simpática, alterações inflamatórias locais e uma eventual neovascularização deficiente do retalho em seu leito receptor. Porém são secundários frente à importância da fisiopatologia proposta. (FANG et al. 2019)

3.1 Lesão Isquemia-Reperusão (LIR)

A lesão de isquemia-reperusão é um dos fatores determinantes da perda de retalhos cutâneos na cirurgia reconstrutiva. Embora seja um tópico muito estudado no contexto de transplantes em geral e no aumento da sobrevivência dos retalhos, seus mecanismos biológicos ainda merecem mais atenção para uma elucidação mais ampla. (BALLESTÍN et al. 2018; FANG et al. 2019)

As LIRs ocorrem geralmente de 24 a 48 horas após a recanalização da isquemia com o fluxo sanguíneo. Esse processo é capaz de agravar o dano tecidual. É um evento precoce nos procedimentos de RC e um importante processo subjacente à necrose de retalhos cutâneos aleatórios isquêmicos. (BALLESTÍN et al. 2018; LUCAS 2017)

Os tecidos em isquemia produzem uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos. Quando o fluxo sanguíneo é finalmente restabelecido, os radicais livres acumulados atacam as células do tecido, resultando em uma lesão de reperusão isquêmica. Ao mesmo tempo, a capacidade do tecido isquêmico em eliminar as EROs é dificultada, o que intensifica os danos causados pelos radicais livres ao tecido de reperusão de isquemia. Os radicais livres ativam as mitocôndrias, assim como endonucleases endógenas e proteínas quinases, resultando em morte celular programada e necrose distal do retalho. (CAI et al. 2019; FANG et al. 2019)

Gemperli estudou a oclusão das estruturas dos pedículos vasculares isoladamente em retalhos cutâneos epigástricos após 2, 3, 4 ou 5 dias da elevação dos retalhos e avaliou a taxa de necrose tecidual no décimo dia pós-operatório, pois considerou que esse período de 10 dias da elevação do retalho é o período final de estabelecimento da necrose tecidual. Como conclusão, obtiveram que a drenagem arterial e venosa são importantes para a circulação do retalho somente até cinco dias após a oclusão do pedículo, após esse período, a neoangiogênese sustenta a vascularização do retalho. (GEMPERLI et al. 2013)

3.2 Inflamação

Quando há lesão tecidual, como ocorre na elevação de retalhos cutâneos, uma resposta inflamatória ocorre de forma controlada. Essa resposta é agudamente mediada pela liberação extracelular de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, interleucinas e cininas. Estas substâncias causam um aumento na permeabilidade microvascular, com uma subsequente elevação na concentração de células inflamatórias e proteínas dentro do meio extracelular. A consequência do processo inflamatório é o edema tecidual, que pode reduzir ainda mais a perfusão do retalho comprometido na fase aguda. A resposta inflamatória, no entanto, leva ao início da síntese de prostaglandinas que, entre outras funções, resulta em vasodilatação local. Em um quadro patológico, os efeitos negativos da inflamação suplantam os efeitos positivos, prejudicando a viabilidade geral dos retalhos. Quando as respostas inflamatórias são exacerbadas, a atenuação da inflamação favorece o restabelecimento da homeostase da região.(BALLESTÍN et al. 2018; DE FREITAS e HAMBLIN 2016; LUCAS 2017; MOON et al. 2018)

3.3 Denervação Simpática

A criação do retalho resulta não só na ruptura da inervação sensorial cutânea, mas também na inervação simpática dos tecidos envolvidos. Essa ruptura nervosa simpática resulta na liberação de catecolaminas do terminal nervoso e prejudica a recaptção de neurotransmissores, resultando em um estado hiperadrenérgico relativo e vasoconstrição local. Essa vasoconstrição é um mecanismo homeostático (LUCAS, 2017). Porém, contribui para a diminuição do fluxo

sanguíneo dentro do retalho, que já está comprometido pelo procedimento. No contexto fisiológico deveria ocorrer uma vasodilatação de rebote, devido à perda do tônus simpático. Porém o contexto da LIR acarreta lesão endotelial irreversível que impede o restabelecimento do fluxo sanguíneo. (LUCAS 2017)

3.4 Angiogênese Deficiente

A neovascularização ocorre por meio de dois mecanismos distintos, como a angiogênese e a vasculogênese. Angiogênese refere-se à formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede capilar pré-existente. Quando o fluxo sanguíneo é insuficiente na porção distal do retalho, ocorre a necrose. (CAI et al. 2019; DAS NEVES et al. 2017; ZHOU et al. 2016)

Acredita-se que as EROs induzam a angiogênese por meio de várias vias moleculares conhecidas, incluindo as vias Nox1 / SHP-1 28 e CEP / TLR2 29 . Entretanto, estudos recentes indicaram que uma quantidade excessiva de EROs, como ocorre na LIR, inibe a angiogênese, prejudicando a perfusão distal dos retalhos. (ZHOU et al. 2016)

Diante de todos os processos fisiopatológicos que levam à perda do RC, a LIR é o evento delineador do conjunto de eventos que culminam na necrose tecidual. Dessa forma, a busca de um método terapêutico que crie um mecanismo contra os gatilhos desse desfecho indesejável deve se basear, primariamente, em diminuir a inflamação patológica do tecido cutâneo que será usado para a reconstrução.

4. TRATAMENTOS COADJUVANTES

Estudar tratamentos coadjuvantes para minimizar a perda de retalhos irá contribuir para reduzir a morbidade dos procedimentos, salvar vidas e economizar recursos. Um planejamento cirúrgico minucioso é o primeiro fator de proteção ao retalho, quando é possível conferir um pedículo seguro e uma sutura sem tensão. Considerando a complexidade das complicações e a sua moderada taxa de

ocorrência, dado que nem sempre é possível elevar retalhos em condições ideais, os tratamentos que favorecem a vascularização tecidual têm sido cada vez mais pesquisados.

No âmbito farmacológico, há grupos que defendem alternativas farmacológicas como o uso de drogas vasodilatadoras, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores de Prostaglandinas (PGI), anticoagulantes, alfa e beta bloqueadores, entre outras alternativas. Contudo, a grande maioria dessas drogas causam efeitos sistêmicos tão indesejados, que as tornam inviáveis para a prática clínica.(FANG et al. 2019; ZHOU et al. 2016)

Por outro lado, há grupos mais promissores que buscam alternativas não farmacológicas para evitar o processo necrótico. Os campos de pesquisa dessa vertente incluem acupuntura, eletroestimulação, terapia por pressão negativa ultrassom com baixas frequências e a fotobiomodulação, todos ainda com resultados frustos. (HERSANT et al. 2015)

O uso de terapia por pressão negativa pode reduzir o edema mecanicamente e melhorar a perfusão do retalho. Wada e colegas utilizaram essa terapia abaixo de retalhos cutâneos por 48 horas em um modelo experimental de retalhos isquêmicos em porcos o que causou redução da área de isquemia em comparação com retalhos controles, porém o uso de terapia por pressão negativa sobre de retalhos cutâneos por 48 horas no mesmo modelo experimental não causou redução da área de isquemia em comparação com retalhos controles. (WADA, A. et al 2013)

Atualmente não é utilizado rotineiramente nenhum tratamento adjuvante à cirurgia de elevação de retalhos, por existirem poucos resultados que, de fato, comprovem o aumento da sobrevivência dos retalhos na literatura. Esse contexto é um importante motivador do presente trabalho, uma vez que diversos estudos demonstram que a fotobiomodulação é um método promissor na promoção do aumento da sobrevida de RCs.

5. LASERTERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

A primeira evidência da ação da irradiação de laser de baixa intensidade veio dos experimentos do Dr. Endre Mester, na Semmelweis Medical University, na Hungria, em 1967. O experimento consistia em raspar as costas de um camundongo e implantar um tumor através de uma incisão na pele. Mester usou um laser de rubi (694 nm) na tentativa de reproduzir um experimento anterior de McGuff em Boston. O objetivo era tentar curar o tumor. Porém o laser utilizado por Mester não possui a mesma eficácia que o de McGuff. Assim, não conseguiu curar o tumor. Porém notou uma taxa de crescimento de pêlos maior nos animais do grupo que utilizou o laser como intervenção, em relação ao grupo controle deste experimento. A partir daí desenvolveu-se a ideia de que o laser agia sobre as células de forma trófica. Com base nessa idéia, Mester passou a utilizar o laser no estudo de cicatrização de feridas, bem como em estudos clínicos.(DE FREITAS e HAMBLIN 2016)

A Terapia com Laser de Baixa Intensidade (fotobiomodulação) consiste no uso de luz na região vermelha ou quase infravermelha (NIR), com comprimentos de onda na faixa de 600nm a 700nm e 780nm a 1100nm (intervalo entre 700 nm e 780 nm é bastante ineficaz). Os lasers comumente possuem uma densidade de potência de 5 mW/cm² a 5W/cm².

A luz vermelha é escolhida, pois sua penetração através do tecido é máxima e mais profunda nessas faixas de comprimento de onda (figura 1). Isso ocorre, pois há uma menor dispersão e uma maior absorção pelos cromóforos teciduais.

(LEITE et al. 2017; MARTIGNAGO et al. 2018)

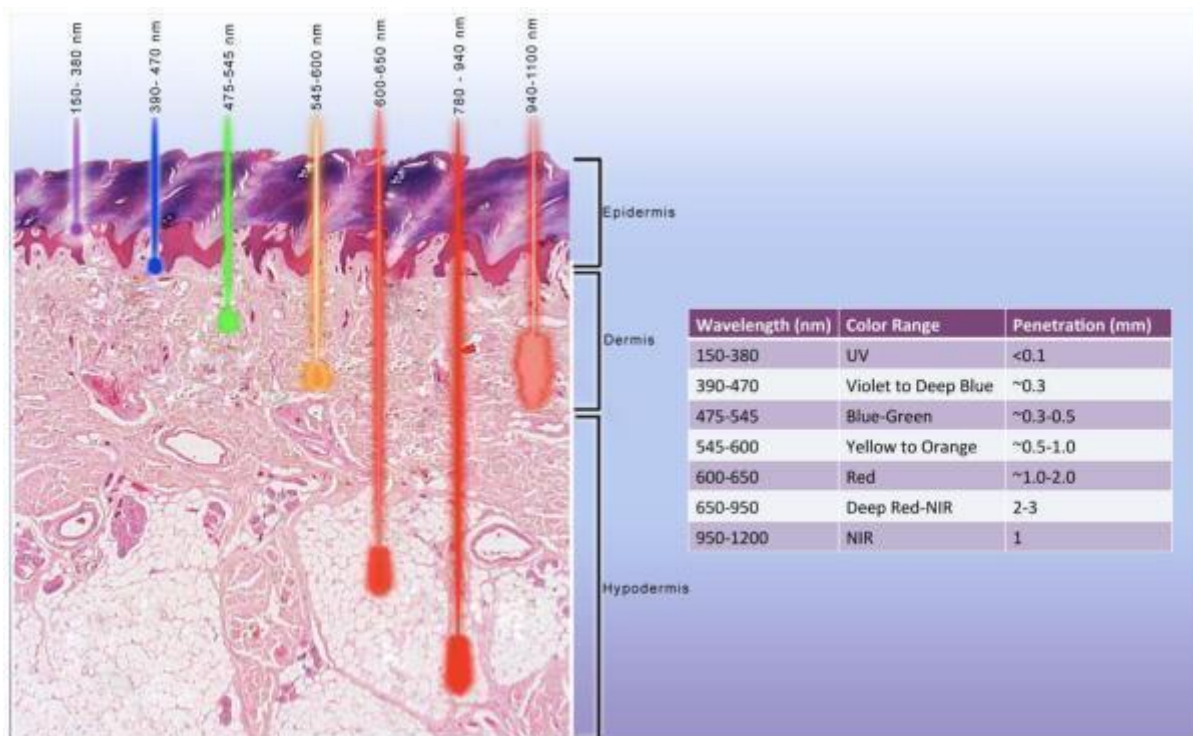


Figura 1: Penetrância dos diferentes comprimentos de onda e faixas de cor. (Avci et al, 2013).

Um dos mecanismos mais aceitos para interação célula-luz foi proposto por Karu (Karu et al. 2008), referindo-se à sinalização mitocondrial retrógrada que ocorre com a ativação da luz na faixa do visível e infravermelho (Figura 1). Segundo Karu, o primeiro passo é a absorção de um fóton com energia pelo cromóforo Cox. Essa interação aumenta o potencial de membrana mitocondrial, causando aumento na síntese de ATP e alterações nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), Ca^{2+} e NO. Além disso, existe uma comunicação entre as mitocôndrias e o núcleo, impulsionada por alterações na ultraestrutura das mitocôndrias, ou seja, alterações na homeostase de fusão-fissão em uma rede mitocondrial dinâmica. A alteração na ultra estrutura mitocondrial induz alterações na síntese de ATP, no potencial redox intracelular, no pH e nos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). A proteína ativadora-1 (AP1) e o NF- κ B têm suas atividades alteradas por mudanças na permeabilidade da membrana e no fluxo iônico na membrana celular. Algumas rotas complementares também foram sugeridas por Karu, como a regulação direta para cima de alguns genes.

Os cromóforos primários foram identificados como o citocromo c oxidase nas mitocôndrias e nos canais iônicos de cálcio. Os efeitos incluem aumento da produção de ATP, uma breve explosão de EROs, um aumento no óxido nítrico e a modulação dos níveis de cálcio (Figura 2). Além disso, há ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição, levando a uma melhor sobrevivência celular, aumento da proliferação e migração, e nova síntese proteica. Descobriu-se que o LBI pode produzir ROS em células normais, mas quando usado em células sob estresse oxidativo ou em modelos animais de doença, os níveis de ROS são reduzidos. O LBI, também é capaz de regular positivamente as defesas antioxidantes e reduzir o estresse oxidativo.(CALIS et al. 2019; LEITE et al. 2017; MARTIGNAGO et al. 2018)

Uma resposta de dose bifásica foi frequentemente observada em estudos da fotobiomodulação em que níveis baixos de luz têm um efeito muito melhor na estimulação e na reparação de tecidos do que níveis superiores de luz. Geralmente as fluências de vermelho ou NIR tão baixas como 3 ou 5J/cm² serão benéficas *in vivo*, mas exageradas, como 50 ou 100 J/cm² podem ser prejudiciais.(CALIS et al. 2019; DE FREITAS e HAMBLIN 2016; GAVISH et al. 2004)

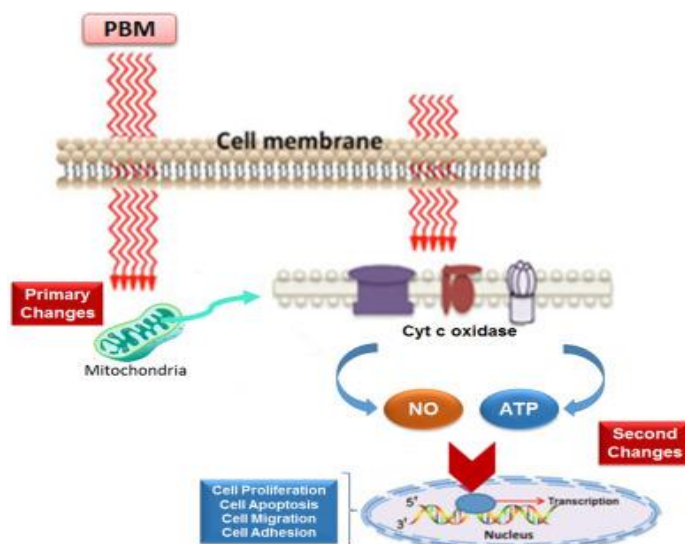


Figura 2: Mecanismo de ação do LBI. Segundo Karu, o primeiro passo é a absorção de um fóton com energia pelo cromóforo Cox. Essa interação aumenta o potencial de membrana mitocondrial, causando aumento na síntese de ATP, transcrição e proliferação celular. (Karu et al. 2008)

Um dos efeitos mais importantes do LBI é uma redução geral da inflamação, que é particularmente importante no contexto de um possível tratamento adjuvante aos procedimentos de RC. Estudos mostram que a fotobiomodulação é capaz de diminuir a concentração da enzima Cicloxigenase -2 (COX-2) em retalhos cutâneos implantados em ratos. (ESTEVEES et al. 2012) Dessa forma, como consequência é possível a sua ação na produção de citocinas primordiais no processo inflamatório, como Interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral – Alfa (TNF- alfa)(HAMBLIN 2017). Em consequência, possui a capacidade de diminuir o número de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos). (DE FREITAS e HAMBLIN 2016; ESTEVES et al. 2012; HAMBLIN 2017).

5.1 LBI e Retalhos Cutâneos

A fotobiomodulação tem sido pesquisada por comprovada melhora da microcirculação e, conseqüentemente, aumento da viabilidade do retalho cutâneo. Ela é muito segura, pois são utilizadas potências baixas para que não exista aumento de temperatura local e conseqüentemente evitar qualquer dano térmico. (ESTEVEES et al. 2012; ORIGINAL 2011; PINFILDI et al. 2013)

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da fotobiomodulação na aceleração do processo de cicatrização, na promoção de analgesia e no aumento da microcirculação. (ARRUDA et al. 2007; DAS NEVES et al. 2017; DUNGEL et al. 2014; KUBOTA 2002; LIU et al. 2018; MOON et al. 2018)

De forma sintética, o LBI desencadeia no RC uma resposta celular em nível molecular na cadeia respiratória mitocondrial, favorecendo os eventos celulares que aumentam a cicatrização. (OTTERÇO et al. 2018)

A perda de retalhos cutâneos geralmente é consequência da hipoperfusão tecidual por redução da microcirculação local. Considerando que alguns autores já demonstraram que a fotobiomodulação melhora a microcirculação e a perfusão local (GAVISH et al. 2004; KUBOTA 2002), e que já foram estudadas diversas dosimetrias (PINFILDI et al. 2013), julgamos necessário um estudo prospectivo para avaliar a eficácia desta forma de irradiação em uma dosimetria segura.

5.2 LBI e Angiogênese

Estudos comprovaram que o LBI age de forma indiscutível no aumento de VEGF. A partir dessa conclusão, grupos de pesquisadores apoiaram-se nesse conceito para investigar a ação desse agente terapêutico na promoção de uma maior viabilidade dos retalhos cutâneos.(CORAZZA et al. 2007; DAS NEVES et al. 2017; KUBOTA 2002; LUCAS 2017; PINFILDI et al. 2013)

O VEGF regula a proliferação, diferenciação e migração de células endoteliais vasculares, contribuindo para a formação de novos capilares. Ele também promove a formação e maturação da luz neovascular, aumentando também o número de capilares. Além disso, pode melhorar a taxa de sobrevivência de retalhos após o transplante, reduzindo a necrose do retalho. O VEGF inicia a cascata de eventos que culminam com a angiogênese e aumenta a capacidade anti-infecciosa do retalho.(CORAZZA et al. 2007; DAS NEVES et al. 2017)

O LBI age, também, sobre as células progenitoras endoteliais, estimulando-as, incluindo as células CD34 positivas, que são as responsáveis pela neovascularização e manutenção da função endotelial vascular. Esse estímulo faz com que elas migrem para o local em isquemia, promovendo uma angiogênese significativamente maior. (DAS NEVES et al. 2017)

5.3 LBI e protocolos de aplicação

Não há uma forma protocolizada de aplicação da fotobiomodulação que seja aceita na sociedade científica como a padrão para o uso terapêutico adjuvante à elevação de RCs. (CORAZZA et al. 2007; DE FREITAS e HAMBLIN 2016; GAVISH et al. 2004; HERSANT et al. 2015; MARTIGNAGO et al. 2018; ORIGINAL 2011; PINFILDI et al. 2013).

Há diversos estudos que expõem resultados importantes de acordo com determinados padrões de aplicação. O desafio maior dos grupos de cientistas é condensar os benefícios obtidos em diferentes técnicas em um método padrão de terapêutica. A divergência entre as técnicas está relacionada à quantidade e

distribuição de energia, pois as dimensões dos retalhos são tão importantes quanto a distribuição das regiões de aplicação. (DE FREITAS e HAMBLIN 2016; PINFILDI et al. 2013)

Pinfield et al, em 2013, por exemplo, atesta que a liberação de VEGF ocorre com a aplicação em ponto único no pedículo do RC, tanto para 6 J/cm² quanto para 144 J/cm². Denotando que esse desfecho favorável ocorre sob maiores densidades de energia.

Na modulação do processo inflamatório, baseando-se na expressão de TNF-alfa e nos níveis de infiltrado tecidual, tem-se redução significativa das variáveis em questão, quando é aplicado fotobiomodulação com 670 nm, 30 W e densidade de 14,28 J/cm². Isso permite concluir que há um estímulo favorável ao processo de cicatrização.(OTTERÇO et al. 2018)

No caso do FGF, que é secretado pelas células epiteliais e tem um papel importante na cicatrização, notou-se seu aumento significativo em RC, atingindo pico entre 12 e 16 horas após a irradiação com laser de 904 nm e 10 J/cm². (LEITE et al. 2017)

Junior et al, em 2017, relata que sob uma energia de 7,30 J, com um laser de 660 nm ocorre um processo de modulação da COX-2, reduzindo a extensão de necrose do RC, algo que ocorreu em contraste com a irradiação de 0,29 J.

De uma forma geral, técnicas com comprimentos de onda no espectro da luz vermelha visível (632,8 nm, 660 nm, 670 nm) e infravermelho (730 nm e 830 nm) são as mais utilizadas. No caso das potências, a variação está entre 2,75 W a 100 mW, onde a duração de exposição varia de 2 a 60 segundos. Já as densidades de energia variam de 0,19 a 185 J/cm² e as energias depositadas variam de 0,0825 J a 3,6 J. (DAS NEVES et al. 2017)

Além das variáveis físicas do LBI, a maneira pelo qual o tempo de irradiação é distribuído no tecido está relacionada com a eficácia do tratamento. Estudos evidenciam que menos pontos irradiados são mais efetivos que mais pontos. Sendo

essa conclusão obtida pela redução da extensão da necrose em RCs de ratos, bem como pelo aumento da síntese de colágeno do tecido desses animais.(MARTIGNAGO et al. 2018; PINFILDI et al. 2013)

Não há diferença significativa quando utilizada a fotobiomodulação no pré ou no pós-operatório. Ou seja, se é usado como um procedimento de demora ou como um método terapêutico. (CALIS et al. 2019)

Diante de um panorama tão otimista acerca das propriedades da fotobiomodulação e observando sua capacidade anti-inflamatória, angiogênica e antioxidante; é de grande importância estudar um método de aplicação intra-operatória em um estudo prospectivo. As conclusões poderão nortear a formulação de um protocolo de aplicação da fotobiomodulação em pacientes a fim de que se obtenha resultados favoráveis à sua utilização como método terapêutico adjuvante aos retalhos cutâneos.

6. JUSTIFICATIVA

A perda de retalhos cutâneos é uma complicação extremamente grave, colocando a vida do paciente em risco em muitos casos. Não existe na atualidade, tratamento adjuvante que melhore a sobrevivência de retalhos cutâneos, sem efeitos colaterais ou riscos significativos. O laser de baixa intensidade mostrou-se bastante favorável em feridas complexas e poderá revolucionar a cirurgia plástica em sua utilização adjuvante em retalhos cutâneos.

7. OBJETIVOS

7.1 Geral

- Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade sobre retalhos cutâneos de camundongos.

7.2 Específicos

- Investigar o efeito da fotobiomodulação na extensão da necrose do retalho cutâneo.
- Investigar o efeito da fotobiomodulação nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias.
- Investigar o efeito da fotobiomodulação no infiltrado inflamatório do retalho cutâneo.

8. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e aprovado sob o número de protocolo CEP 5380040918 (Anexo).

Assim, desenvolvemos esse estudo experimental, intervencional e randomizado. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da UNINOVE, atendendo às Normas Éticas para Experimentação Animal do Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCALCOBEA) e a legislação nacional atual sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal 11.794, de 9 de outubro de 2008).

8.1 Animais

Foram utilizados neste estudo 48 camundongos Balb/C com peso entre 22-25 g, provenientes do biotério da UNINOVE. Os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo ração e água ad libitum, em um ambiente controlado cujo ciclo claro-escuro foi de 12 horas e a temperatura de 21°C.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos da seguinte maneira:

Grupo 1 – controle de 4 dias (G1) – controle com retalho cutâneo randômico e simulação da emissão da irradiação laser (n = 8) e eutanásia em 4 dias;

Grupo 2 - experimental de 4 dias (G2) – grupo com retalho cutâneo randômico submetido à irradiação laser = 660 nm em toda a extensão do pedículo vascular durante a cirurgia de elevação do retalho, a 2,25 J/cm² de exposição radiante, com irradiância de 2,5 W/cm²., durante 20 segundos.

Grupo 3 – controle de 7 dias (G3) – controle com retalho cutâneo randômico e simulação da emissão da irradiação laser (n = 8) e eutanásia em 7 dias;

Grupo 4 - experimental de 7 dias (G4) – grupo com retalho cutâneo randômico submetido à irradiação laser = 660 nm em toda a extensão do pedículo vascular durante a cirurgia de elevação do retalho, a 2,25 J/cm² de exposição radiante, com irradiância de 2,5 W/cm², durante 20 segundos.

Grupo 5 – controle de 10 dias (G5) – controle com retalho cutâneo randômico e simulação da emissão da irradiação laser (n = 8) e eutanásia em 10 dias;

Grupo 6 - experimental de 10 dias (G6) – grupo com retalho cutâneo randômico submetido à irradiação laser = 660 nm em toda a extensão do pedículo vascular durante a cirurgia de elevação do retalho, a 2,25 J/cm² de exposição radiante, com irradiância de 2,5 W/cm², durante 20 segundos. Irradiação laser de baixa intensidade

O dispositivo laser utilizado foi Laser da marca DMC® modelo Therapy XT e os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos do Laser de Baixa Intensidade

Comprimento de onda	660 nm
Densidade de energia	2 J/cm ²
Potência de saída	100 mW
Tempo	20 segundos
Regime	contínuo
Modo de aplicação	varredura
a. Número de Tratamento	01

8.2 Técnica Operatória

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Xilazina (100 mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (10 mg/kg) para controle analgésico. Subsequentemente, os animais foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos membros e submetidos à depilação de seu dorso e demarcação da área do retalho cutâneo randômico de base cranial, respeitando-se como limites anatômicos os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica dos animais (Figura 3A). Foi confeccionado o retalho cutâneo randômico de base cranial após marcação cirúrgica cuidadosa, com 3 cm de comprimento e 1 cm de largura, elevados do dorso dos animais de ambos os grupos.

O retalho (Figura 3B) constituído pela fáscia superficial, panículo carnoso, tecido subcutâneo e pele, depois de elevado, foi reposicionado em sua localização original, após a interposição de uma barreira plástica (Figura 3C) entre a fáscia superficial e a camada muscular superficial, com as mesmas dimensões do retalho, para evitar revascularização do retalho pelo leito.

Após o reposicionamento do retalho, foi realizada a sutura com pontos simples com fio de náilon monofilamentar 4-0 de meio em meio centímetro (Figura 3D).

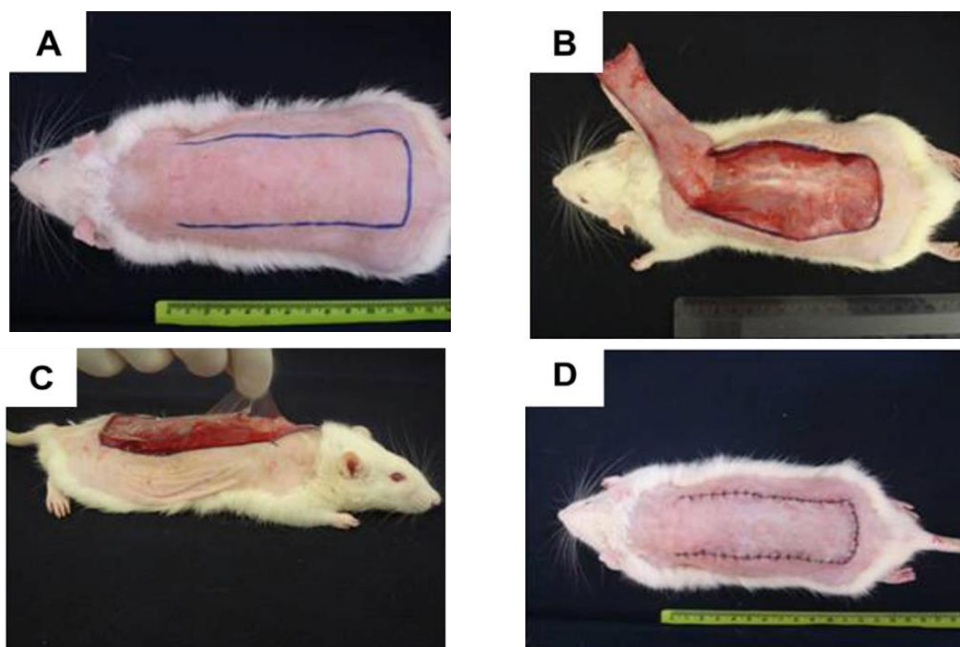


Figura 3: Técnica cirúrgica amplamente padronizada na literatura por Mcfarlane em 1965.

Após este procedimento, os animais dos grupos controles, 1, 3 e 4, foram submetidos ao probe do equipamento de emissão de irradiação laser, por 20 segundos em varredura no pedículo vascular, mas sem ocorrer a emissão de laser. Os animais do grupo experimental, 2, 4 e 6 receberam a irradiação do laser com 660 nm, 2 J/cm² de densidade de energia, por 20 segundos em varredura no pedículo vascular, na base do retalho.

A técnica de irradiação contou sempre com o posicionamento da caneta de forma a garantir que os feixes de luz incidissem a 90° com o pedículo vascular. Irradiamos em uma área de 1cm x 1cm na face ventral do pedículo em varredura contínua em 3 linhas horizontais por 20 segundos. Em todas as irradiações, a técnica de contato foi utilizada.

Os animais foram submetidos à analgesia logo após o procedimento cirúrgico, que consistiu em Tramadol 8 mg/kg IP – 8 / 8 hs, por 3 dias. Os animais foram submetidos à eutanásia nos dias 4, 7 e 10 de pós-operatório de acordo com o grupo a que pertencia.

8.3 Análise da Área de Necrose

Utilizamos fotografias padronizadas dos retalhos cutâneos, realizadas com auxílio de um tripé, com distância focal de 20 cm. Utilizamos a máquina fotográfica Canon EOS Rebel T7i, lente EFS 18-55mm, macro 0,25m/0,8ft, com estabilizador de imagem, no dia da eutanásia, por grupos.

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi realizada por fotografia digital padronizada e análise computacional, sendo que foi considerado como limite de tecido viável aquele caracterizado por pele macia, rósea, quente e com pêlos, enquanto o tecido necrótico por pele rígida, escurecida, fria e sem pêlos. Essas áreas foram demarcadas nos animais e analisadas de forma computacional oferecendo a possibilidade de se verificar qual a porcentagem de tecido necrótico obtida em cada um dos grupos. Para a comparação das áreas de necrose entre o grupo submetido ao laser com o grupo controle, utilizamos a análise computacional com o programa Image J (do National Institutes of Health).

8.4 Análise Histológica de Células Inflamatórias

Para a análise das células inflamatórias, foram realizados cortes longitudinais na transição entre pele saudável e o início da necrose tecidual para analisarmos a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo superficial (Figura 4). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 20 x. Para a comparação entre os grupos, utilizamos uma área aleatória padrão de 700 x 600 pixels.

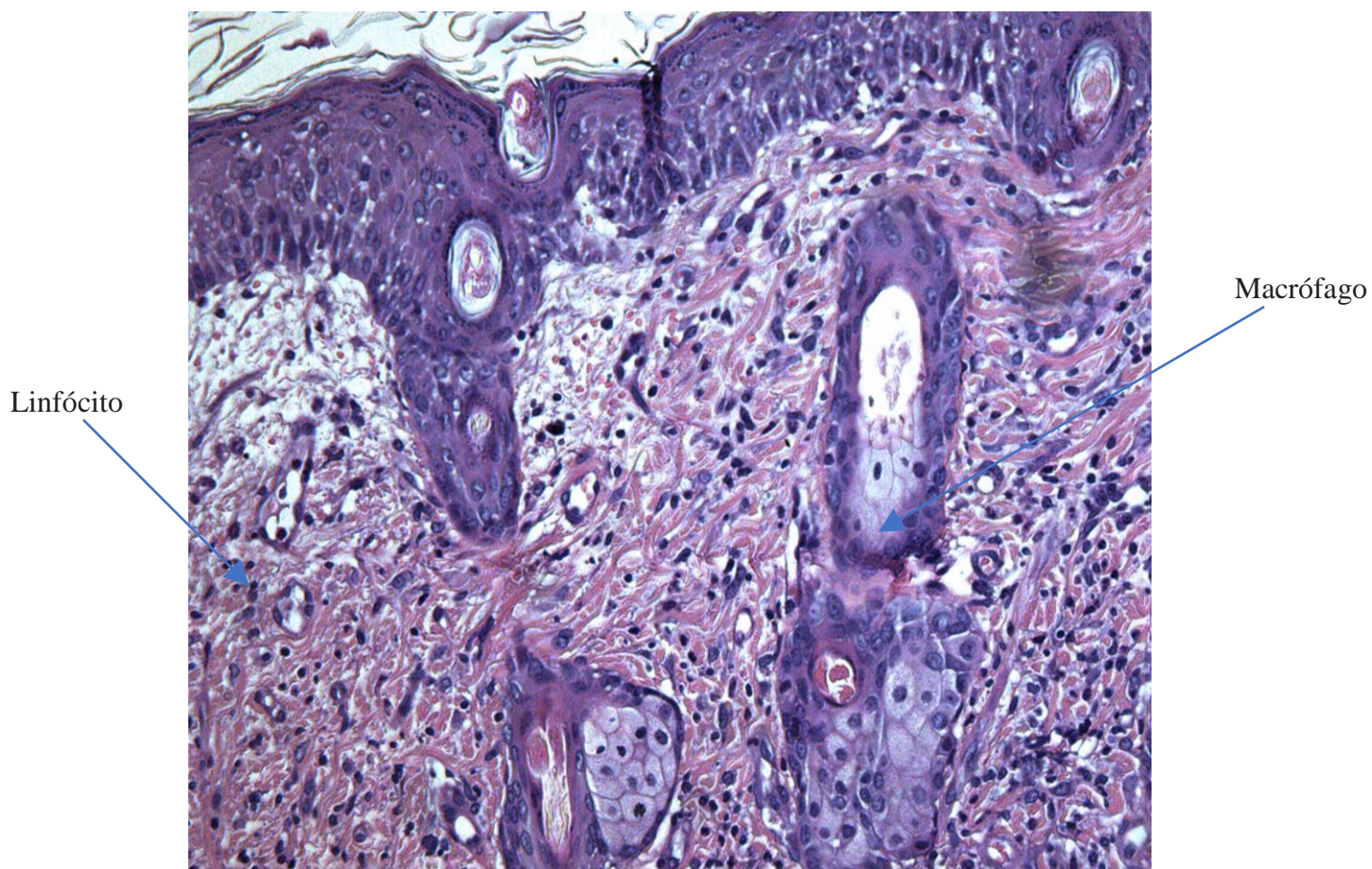


Figura 4. Cortes Histológicos com a contagem de células inflamatórias, linfócitos e macrófagos, em cortes de pele na transição entre a pele sadia e a necrose. Nas setas, exemplos de cada célula.

8.5 Análise Histológica da destruição celular

Para a análise da destruição celular, foram realizados cortes longitudinais na transição entre pele saudável e o início da necrose tecidual para analisarmos a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo superficial. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 20 x. Para a comparação entre os grupos, utilizamos uma área aleatória padrão de 700 x 600 pixels. Foi dado um escore de 1 a 4 para determinar a destruição celular. Sendo escore 1: uma porcentagem de 0-25% de destruição; escore 2 uma porcentagem de 26-50% de destruição; escore 3 uma porcentagem de 51-75% de destruição e escore 4 uma

porcentagem de 76-100% de destruição.

8.7 Análise Bioquímica

8.7.1 Quantificação das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α :

O sangue dos animais foi coletado para a determinação das citocinas IL-6 e IL-1 β , IL-10 e TNF- α . Em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ L do anticorpo de captura, diluídos em PBS, e incubadas por 2 h, a 37°C. Após esse período, os sítios livres foram bloqueados com 200 μ L de tampão de bloqueio, contendo gelatina 3% em PBS e as placas incubadas por 18h, a 4°C. Após lavagem da placa com PBS/Tween20 0,05%, 50 μ L de amostras ou padrões (recombinantes) foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 1 h, a 37°C. A placa foi lavada com de PBS/Tween20 0,05% e a ligação às citocinas foi detectada pela adição do anticorpo de captura biotilado, diluído em PBS-gelatina 1% (5 μ g/mL, 50 μ L/poço), e incubado por 1 h a 37°C. Após a lavagem da placa, 50 μ L de avidina-fosfatase alcalina, na diluição de 1:15000 em PBS-gelatina 1%, foram adicionados e incubados por 1 h à temperatura ambiente, lavando-se em seguida. Para a revelação, foi utilizado o substrato cromógeno p-nitrofenil fosfato (200 μ L/mL), diluído em 1:5 em TRIS-HCl ph 9,8 1 M e salina 0,5 M. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) a 405 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com a citocina recombinante.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Foram realizados pós teste Tukey e considerada aceitável quando $p \leq 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1 Análise Macroscópica da Área de Necrose

Para a comparação macroscópica das áreas de necrose entre os grupos submetidos ao fotobiomodulação com os grupos controles, utilizamos a análise computacional com o programa Image J (do National Institutes of Health). Pelo programa, delimitamos a área total do retalho e a área de necrose, calculando as porcentagens de necrose em cada grupo. Os resultados demonstraram que o tratamento com o fotobiomodulação causou uma diminuição da necrose em todos os tempos avaliados em relação ao controle (fig. 5). Figuras demonstrativas dos retalhos cutâneos no pós cirúrgico nos dias 4, 7 e 10 (Fig. 6).

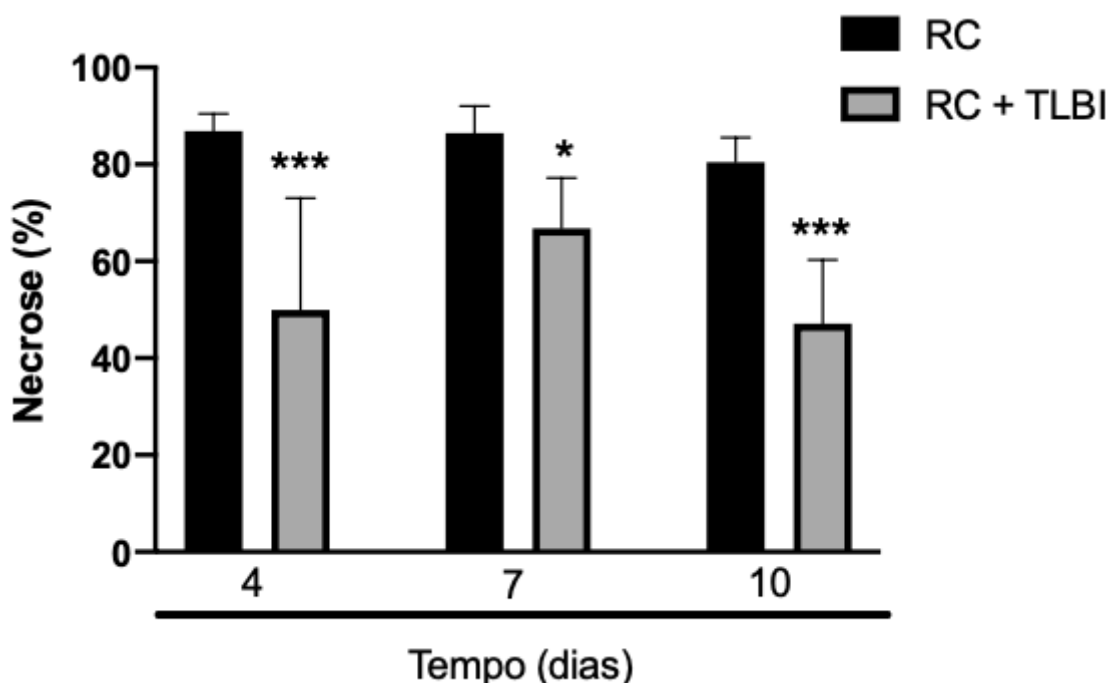


Figura 5: Percentuais médios de necrose do grupo controle submetido apenas à elevação do retalho cutâneo (RC) e do grupo RC tratado com a fotobiomodulação. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

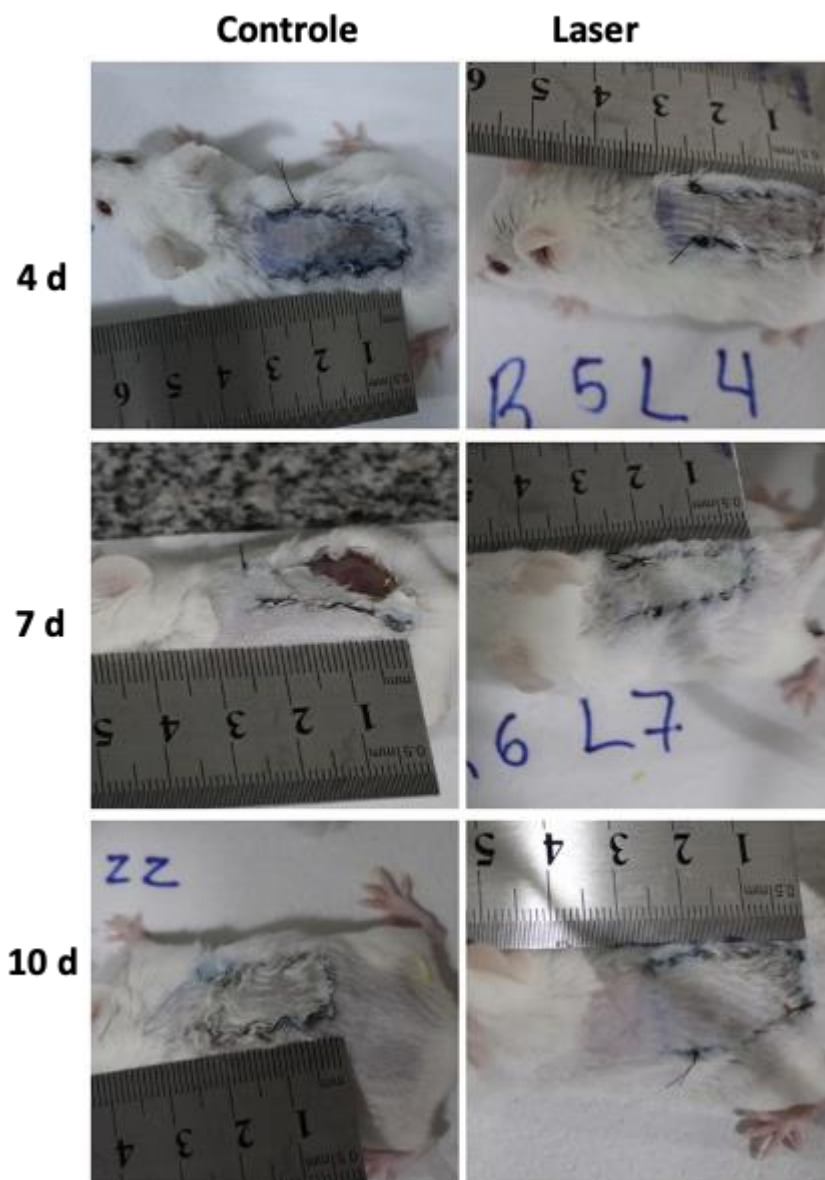


Figura 6: Fotografia do retalho cutâneo dos animais tratados ou não com o laser. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e fotografados nos dias 4, 7 e 10 pós-cirúrgico.

10.2 Análise histológica da destruição celular

A análise da destruição celular causada no retalho cutâneo foi avaliada nas lâminas histológicas na transição entre pele saudável e o início da necrose tecidual. As lâminas foram cortadas em cortes longitudinais para analisarmos a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo superficial. Foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 20x. Os resultados demonstram que o tratamento com o LBI causou diminuição do escore de destruição celular em todos os tempos avaliados quando comparados ao retalho cutâneo sem tratamento (fig. 7).

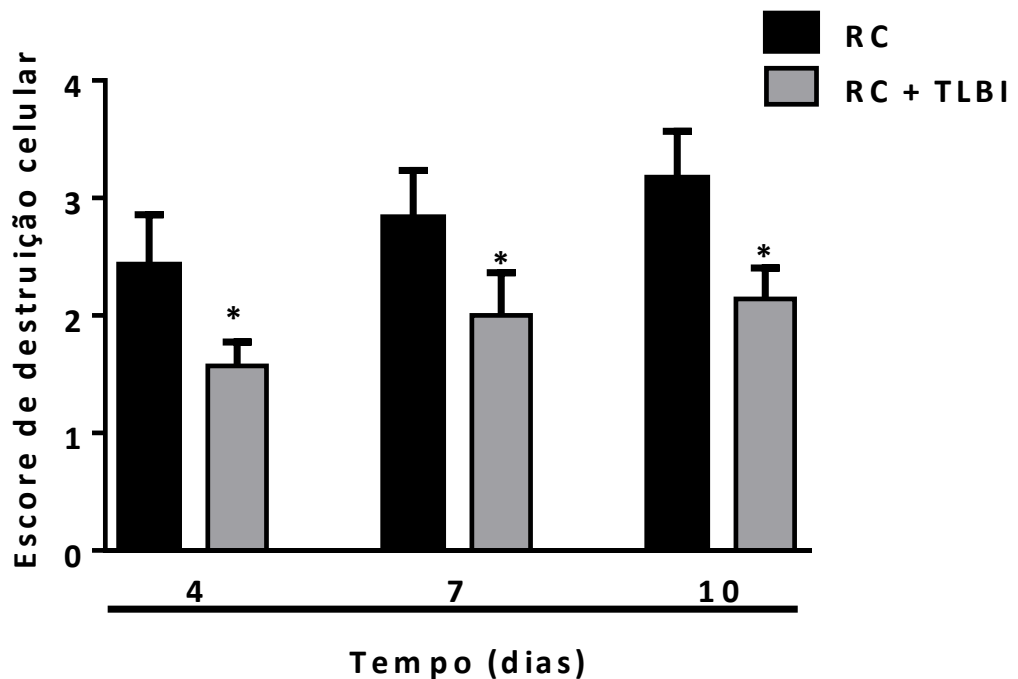


Figura 7: Efeito do laser de baixa intensidade no escore de destruição celular em cortes de pele na transição pele sadia e necrose. Foi feita a comparação da quantidade de células inflamatórias entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 pós-operatório. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

10.3 Análise Histológica de Células Inflamatórias

A análise histológica de células inflamatórias foi realizada na transição entre pele saudável e o início da necrose tecidual. As lâminas foram cortadas em cortes longitudinais para analisarmos a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo superficial. Foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 20x. Para a comparação entre os grupos, utilizamos uma área aleatória padrão de 700x600 pixels e o programa Image J para a contagem de células inflamatórias.

Os resultados demonstraram redução significativa em todos os grupos que foram irradiados com LBI, em todos os dias de pós-operatório. Houve diminuição do número de células inflamatórias nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório (PO) no grupo Experimento, quando comparados com seus respectivos subgrupos, do grupo Controle (fig. 8).

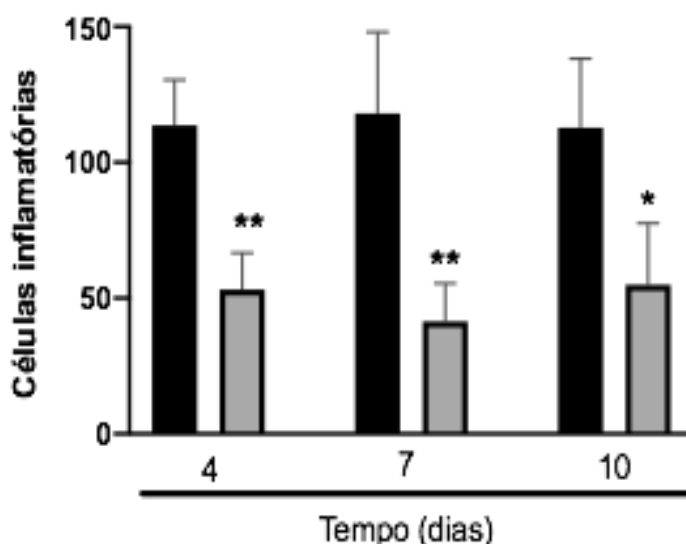


Figura 8: Efeito do laser de baixa intensidade na quantidade de células inflamatórias em cortes de pele na transição pele sadia e necrose. Foi feita a comparação da quantidade de células inflamatórias entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 pós-

operatório. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

10.4 Quantificação das concentrações Interleucina 1 β (IL-1 β)

A interleucina IL-1 β foi mensurada através da técnica de ELISA e está demonstrada na Figura 08. Os resultados demonstraram redução significativa em todos os grupos que foram irradiados com LBI, em todos os dias de pós-operatório. Houve diminuição na liberação de IL-1 β nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório (PO) no grupo Experimental, quando comparados com seus respectivos subgrupos, do grupo Controle (Fig. 9).

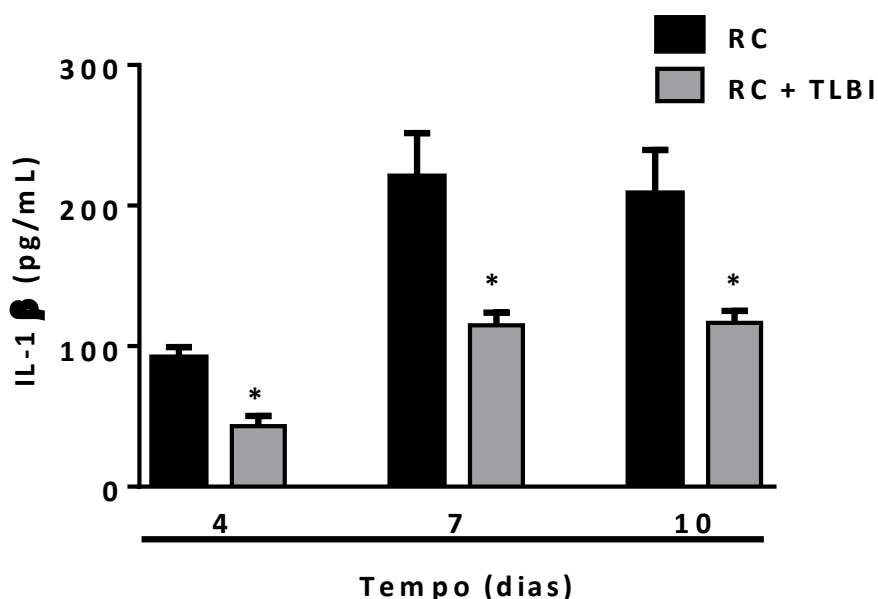


Figura 9: Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-1. Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-1 em retalhos cutâneos dorsais, randômicos, de camundongos. Foi feita a comparação entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório. As citocinas foram mensuradas por meio do teste ELISA do soro dos animais. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

10.5 Quantificação das concentrações de Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina IL-6 também foi mensurada utilizando-se a técnica ELISA. No grupo Controle houve um aumento gradativo dessa citocina com o correr dos dias de pós-operatório. Contudo, foi observado uma diminuição significativa de IL-6 em todos os dias de pós operatório dos animais tratados com laserterapia de baixa intensidade, conforme exposto na Figura 6. Especificamente no grupo Experimento, houve níveis de citocina menores nos dias 7 e 10 de pós operatório, quando comparados com os níveis do dia 4 (Fig. 10).

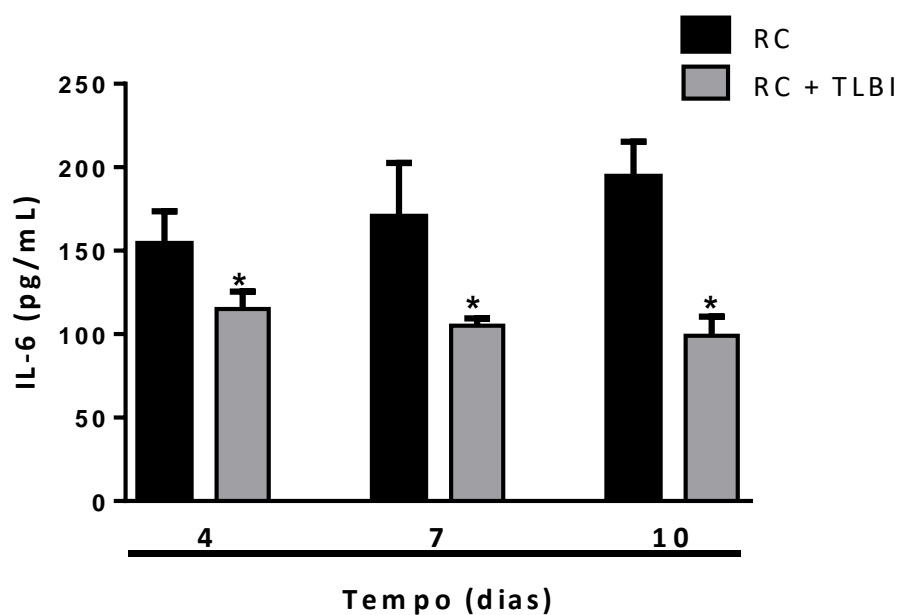


Figura 10. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-6. Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-6 em retalhos cutâneos dorsais, randômicos, de camundongos. Foi feita a comparação entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório. As citocinas foram mensuradas por meio do

teste ELISA do soro dos animais. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

10.6 Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

O TNF- α é um importante marcador de atividade inflamatória, apresentando papel crucial na quimiotaxia dos elementos celulares do processo inflamatório. Quando observamos a sua liberação nos animais que não passaram pela irradiação com laser baixa intensidade, notamos níveis elevados dessa citocina no soro dos elementos do grupo Controle. Por outro lado, nos animais do grupo Experimento, houve uma diminuição significativa da liberação de TNF- α em todos os dias de PO, sendo menor no dia 7, quando comparados com os níveis do dia 4 e do dia 10, conforme podemos ver na figura 11.

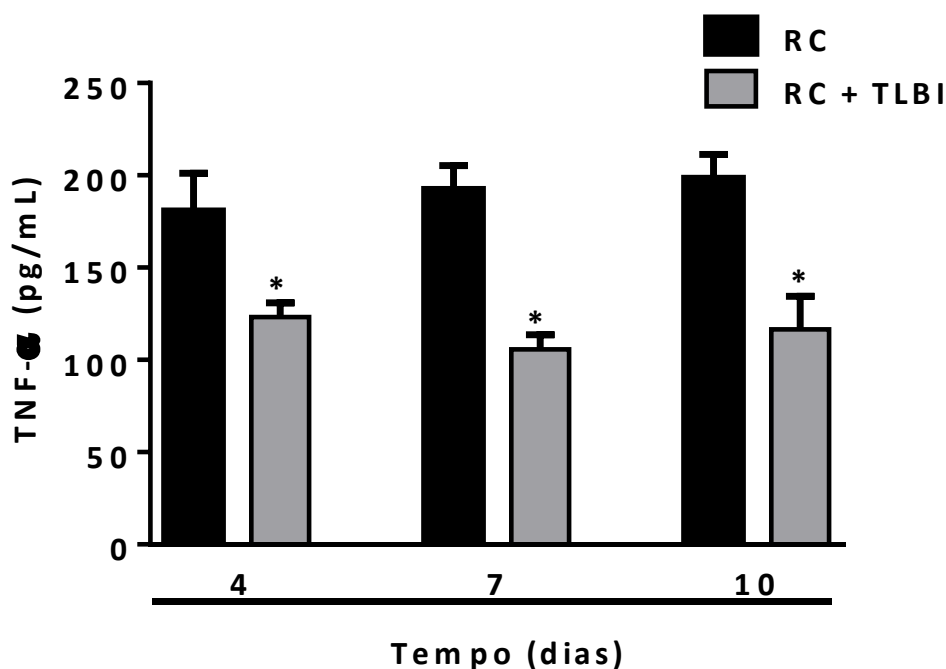


Figura 11: Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de TNF- α . Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina TNF- α em retalhos cutâneos dorsais, randômicos, de camundongos. Foi feita a comparação entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório. As citocinas foram mensuradas por meio do

teste ELISA do soro dos animais. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

10.7 Quantificação das concentrações Interleucina 10 (IL-10)

A observação da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 mostrou no grupo Controle a liberação de níveis baixos, que se mantiveram sem flutuação importante nos dias 4, 7 e 10 de pós-operatório. Porém, quando observamos a liberação de IL-10 no soro dos animais, que passaram pela terapia de fotobiomodulação com LBI, notamos a liberação desta citocina em níveis elevados e sustentados de forma significativa nos três momentos de análise (4, 7 e 10 PO). Essas relações são ilustradas na figura 12.

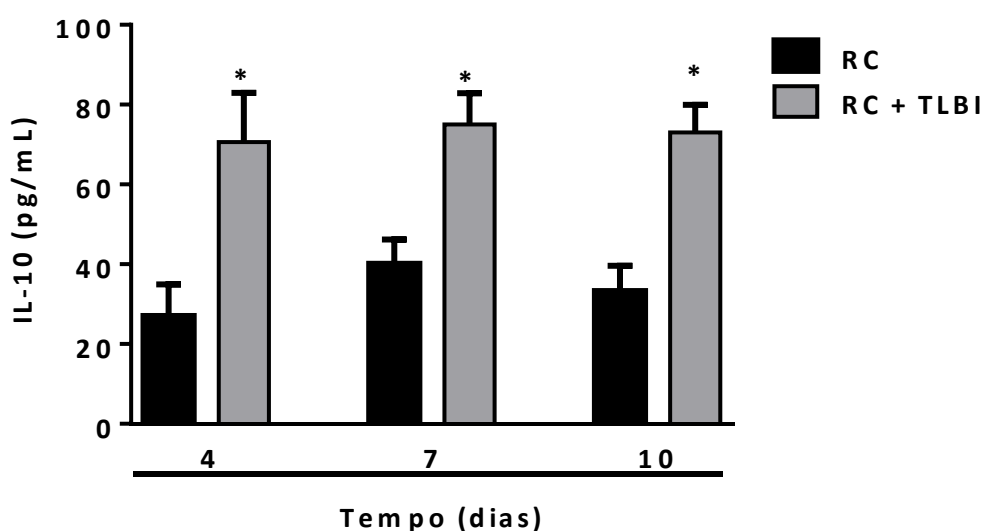


Figura 12: Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-10. Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-10 em retalhos cutâneos dorsais,

randômicos, de camundongos. Foi feita a comparação entre os animais do grupo Controle e os do grupo Experimento nos dias 4, 7 e 10 de pós operatório. As citocinas foram mensuradas por meio do teste ELISA do soro dos animais. Foi realizado o teste ANOVA com pós teste Tukey para estabelecimento das relações estatísticas. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo RC sem tratamento.

11. DISCUSSÃO

Nos confrontamos frequentemente com a perda de retalhos cutâneos (RC) dentro da prática cirúrgica, principalmente quando o retalho é distal aos grandes vasos, como em retalhos em membros inferiores, mãos e cabeça e pacientes com comorbidades.

Utilizamos camundongos neste projeto por já termos disponível material para a dosagem de citocinas inflamatórias deste modelo animal. Em consonância com o que há na literatura, obtivemos uma redução significativa da porcentagem de necrose distal nos retalhos dos animais submetidos à irradiação pelo laser em todos os períodos analisados.

Martignago e colaboradores testaram o efeito do laser em aplicação de 660 nm, com potência de 50 mW, por um tempo total de 240 s no modo de emissão contínua. O tratamento foi iniciado imediatamente após a realização do retalho cutâneo e reaplicado a cada 24 horas, com um total de cinco aplicações. Os autores relatam que animais irradiados na base cranial do retalho apresentaram diminuição estatisticamente significativa de necrose quando comparados aos não irradiados e aos irradiados em pontos aleatórios no retalho; além disso, os autores mostraram aumento estatisticamente significativo na quantidade de colágeno nos grupos irradiados em relação ao controle, no entanto, sem diferença estatística na expressão de FGF (*fibroblast growth factor*). (MARTIGNAGO et al 2019) De fato, parece ser mais interessante para o efeito biológico a aplicação de laser próximo à base cranial do retalho, como fizemos em nosso trabalho. Estudos de Pinfildi e seus colaboradores chegaram às mesmas conclusões (PINFILDI *et al.*, 2013).

A aplicação do retalho em ratos por diodo laser a 830 nm, 36 J/cm², por 72 segundos imediatamente após a cirurgia e nos quatro dias subsequentes, por protocolo de contato com a superfície do retalho em apenas um ponto a 2,5 cm da base cranial do retalho, foi definida como protocolo experimental para o estudo das ações da LLLT no reparo de retalhos cutâneos por Prado (Prado *et al* 2006). Os autores observaram redução da área necrótica com a aplicação deste protocolo. Em 2012, Prado e colaboradores compararam a irradiação com ondas de 830 nm e com ondas de 670 nm (0,5 mW/cm², 36 J/cm²), tendo concluído que os resultados são melhores com o laser de 670 nm. (PRADO *et al* 2012)

Os estudos de Martignago e colaboradores evidenciam que o local de aplicação da fotobiomodulação a laser é relevante para determinar seu efeito; os autores mostraram que a aplicação em três pontos na base cranial do retalho foi mais eficaz em relação à redução da área de necrose do que a aplicação em 12 pontos aleatórios distribuídos ao longo do retalho. (MARTIGNAGO *et al*, 2019)

Dentro do leque de inúmeras fisiopatologias, a LIR é proposta pela literatura como a norteadora da necrose tecidual, que é o desdobramento patológico da perda do retalho. As suas etapas são delineadas por um processo inflamatório exacerbado, desencadeado pelo insulto tecidual, pela lesão nervosa periférica e pela lesão endotelial. Dentro desse conjunto de comemorativos, a inflamação é a que merece destaque, o cerne dessa discussão, uma vez que atua como o contexto gerador de inúmeras substâncias de vital importância dentro da fisiologia e fisiopatologia inerentes à sobrevivência dos RC. As interleucinas são substâncias de destaque na configuração global da evolução dos implantes de RC, sobretudo a IL-1, IL6, IL-10 e TNF- α .

Retalhos cutâneos irradiados a 670 nm, 30 mW, densidade de energia de 14,28 J/cm² por 15 dias consecutivos mostraram valores mais baixos de infiltrado inflamatório, aumento de colágeno e de sua organização, aumento do VEGF e diminuição do TNF- α Esses dados indicam que a LLLT promove os estímulos necessários para a evolução satisfatória do processo de reparação tecidual. (OTTERÇO *et al.*, 2018).

A IL-1 é um mediador inflamatório, produzida em um primeiro momento pelos macrófagos. Tem papel imprescindível na defesa imunológica. Engloba em

sua composição a IL-1 alfa e a beta, que compartilham de um mesmo sinalizador. Os seus receptores (IL-1R1) são sinalizados pela maioria das células imunes e não imunes, o que justifica o amplo impacto inflamatório dessa citocina. Tem participação tanto na imunidade inata, como na adaptativa. Age como propulsora da cascata de reações que ativarão vários eventos de ativação celular, como a intensificação da transcrição do gene do NF kappa β (Intensificador de cadeia de células B ativadas). Em termos objetivos, a IL-1 permite a produção de IL-6, a regulação positiva de moléculas de adesão de leucócitos, é o principal pirógeno e é importante promotora de produção de citocinas pelas células T. Dentro desse contexto, da fisiopatologia da perda dos RC, a IL-1 é, portanto, um importante alvo terapêutico (LUCAS, 2017).

Ao observarmos a secreção da IL-1 no grupo Experimento com um aumento no período de 4 para 7 dias, porém sustentado de 7 dias para 10 dias, podemos sugerir que a fotobiomodulação agiu de forma positiva na resposta imune imediata, modulando a expressão dessa citocina, que é considerada o gatilho para as cascatas enzimáticas do processo inflamatório e também importante agente quimiotático.

A IL-6 é uma citocina secretada por macrófagos, mediada pela ação da IL-1, na fase aguda da inflamação por lesão tecidual, trauma, estresse, infecção ou outras agressões. Após ser sintetizada em uma lesão local, ela segue para o fígado onde será a desencadeadora de uma série de cascatas, que produzirão as proteínas de fase aguda. Dessa forma, é um sinalizador sistêmico de alerta para todo corpo. Dentre outras propriedades, a IL-6 possui ações positivas na regeneração, como o aumento da produção de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), levando a angiogênese aumentada e permeabilidade vascular aumentada, que, quando exacerbadas são características patológicas de lesões inflamatórias (TANAKA et al. 2014).

No contexto cirúrgico estéril, como é o caso dos RC, um aumento dos níveis de IL-6 precede o aumento da temperatura corporal e de reverberações sistêmicas (PRADO et al. 2006; TANAKA et al. 2014). Além disso, a IL-6 auxilia na geração de colágeno e fibroblastos dérmicos. Essas últimas propriedades são dicotômicas com a fisiopatologia da perda da RC, podendo ser, superficialmente, um elemento protetor da necrose tecidual. Entretanto a literatura nos traz que, pelo fato

da IL-6 ser uma citocina com período de meia-vida longa, quando comparada com as demais interleucinas, os seus efeitos maléficos, diante de uma exacerbação, suplantam os potenciais efeitos benéficos.

A secreção da interleucina 6 no dia 4 do grupo Experimento foi elevada, porém menor e significativa em relação ao grupo Controle. Nos dias 7 e 10 houve uma diminuição sustentada da secreção desses níveis. Ao analisarmos as características fisiológicas da IL-6, vemos que ela possui capacidade de promoção de eventos positivos, como geração de colágeno, VEGF e fibroblastos. Entretanto, no contexto do RC seria importante haver um *cutt-off* da concentração ideal dessa citocina, correlacionada com as características físicas do laser e com o período de meia vida dessa substância, que é maior que o das outras citocinas inflamatórias. Se ao serem feitas as correlações da extensão da necrose tecidual com as concentrações de IL-6 e houver um valor significativo, poderemos sugerir que a laserterapia, de alguma forma, modulou o processo inflamatório de tal maneira a suplantam os efeitos benéficos da IL-6 sobre os maléficos. (PRADO et al. 2006)

O TNF- α , é uma citocina produzida, em grande parte, pelos macrófagos, estimulando, também, a produção de IL-6. Porém é importante, nesse contexto, a sua produção pelas células endoteliais. A lesão endotelial advinda do processo de isquemia promove uma liberação muito importante de Fator de Necrose Tumoral do tipo alpha, que estimula a resposta inflamatória de forma exacerbada, levando a quadros de febre e citotoxicidade sobre células B e T, dificultando a evolução benéfica do processo inflamatório. É necessário ressaltar que altos níveis dessa citocina promovem diminuição da contratilidade do miocárdio, com consequente diminuição da pressão sanguínea. Esses eventos aliados ao relaxamento da musculatura vascular contribuem para agravar o quadro de diminuição de perfusão tissular, que é centro gerador dessa discussão. (CORAZZA et al. 2007; LUCAS 2017).

Quando analisamos a relativa uniformidade das concentrações de TNF- α durante os 3 períodos, podemos sugerir que o insulto que serviu de gatilho para sua liberação está estabilizado. Partindo da premissa que no contexto dos RCs o principal propulsor da liberação dessa substância é a lesão endotelial, há a evidência de que a terapêutica sugerida agiu positivamente sobre o estresse oxidativo que causa a lesão endotelial na LIR, uma vez que não houve variação

dos níveis de secreção dessa interleucina nos 3 tempos analisados.

A IL-10 é um elemento importante no sistema de citocinas. É considerada como o fator de inibição das citocinas humanas, o regulador mestre do processo inflamatório. É produzida por células CD8+ ativadas. Outros leucócitos podem produzi-la, porém são fontes menos importantes. Tem importante função reguladora, inibindo a ação de macrófagos, monócitos e a ativação de células T. É inibida por seus níveis elevados ou por IL-4. (ROJAS et al. 2017).

Os níveis muito elevados de IL-10 do grupo Experimento em relação ao grupo controle, desde o primeiro tempo de análise (4 dias), suscita a evidência que, diferentemente do contexto fisiopatológico sem intervenção, com a fotobiomodulação ocorre uma sinalização direta dessa necessidade às células CD8+ e, muito provavelmente às demais populações de leucócitos, não havendo intermediação de outras citocinas inflamatórias, que em um primeiro momento poderiam exacerbar o processo de inflamação para posteriormente gerar níveis de IL-10 na monta dos observados neste experimento. Esse mecanismo sugeriria uma ação conjunta da laserterapia na modulação negativa de fatores inflamatórios e na modulação positiva de fatores anti-inflamatórios.

A fotobiomodulação tem a sua eficácia respaldada pela literatura como potente agente anti-inflamatório, agindo diretamente na produção da COX-2, sendo portanto eficaz na intervenção do ciclo do ácido araquidônico e, por consequência, eficiente na modulação da secreção das citocinas humanas (OTTERÇO et al. 2018). Não se sabe se a ação da laserterapia interrompe o processo inflamatório ou se promove uma aceleração da degradação dos elementos responsáveis pelo processo inflamatório. Em nosso modelo experimental os resultados obtidos não colaboraram para desfazer essa celeuma. Contudo, preconiza-se que a LTBI age sobre os desfechos da exacerbação da inflamação. Aliado a isso, a fotobiomodulação é capaz de diminuir o estresse oxidativo, modulando o limiar de EROs que é capaz de agir em etapas positivas dos processos fisiopatológicos (HERSANT et al. 2015).

Quando observamos a ação da fotobiomodulação nos retalhos cutâneos randômicos desse experimento foi possível observar uma atuação robusta da fotobiomodulação na contenção da exacerbação dos processos inflamatórios, tanto bioquimicamente quanto pela análise microscópica. Partindo do princípio que a LIR

é o comemorativo fisiopatológico sobressalente no processo da perda dos RC por necrose tecidual, a análise desses resultados permite sugerir uma efetividade da fotobiomodulação profilaxia da inflamação patológica, evitando a perda do retalho por necrose tecidual.

A literatura aborda uma gama de métodos de aplicação com uma diversidade de radiantes de exposição. Neste trabalho utilizamos a laserterapia em adjuvância ao procedimento cirúrgico no intraoperatório em varredura no pedículo vascular. Diferentemente da maioria dos estudos que utilizaram a fotobiomodulação após o procedimento cirúrgico e em vários pontos de aplicação. Essa modalidade de aplicação em varredura é sugerida pela literatura com eficácia no aumento da expressão de VEGF (PINFILDI et al. 2013). Entretanto, não existe descrição na literatura sobre este método de aplicação alterando os níveis de citocinas plasmáticas, sugerindo que a aplicação no intraoperatório gera uma proteção ao retalho por diminuição significativa da expressão de interleucinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α).

Neste trabalho, encontramos importante redução do número de células inflamatórias, o que também foi encontrado no trabalho de Silva (Silva et al 2007) em que, como metodologia, foram realizadas aplicações de LBI em quatro grupos de cinco ratos, nos seguintes parâmetros: 10 mW potência única e 660 nm – 7,5 J/cm²; 660 nm – 15 J/cm² ; 780 nm – 7,5 J/cm²; e 780 nm – 15 J/cm². Os tempos experimentais foram 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Como resultado, ele realizou cortes histológicos e neles, os tecidos epitelial e conjuntivo mostraram renovação celular atípica e acelerada durante o período de irradiação, concluindo que os tecidos epitelial e conjuntivo reagiram à estimulação de LBI com renovação celular constante.

Dentre os benefícios mais evidentes do LLLT são seus efeitos anti-inflamatórios pronunciados, que observamos claramente em nosso estudo com redução de interleucinas inflamatórias e de células inflamatórias. A redução do edema local e reduções nos marcadores de estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias estão bem estabelecidas (HAMBLIN, 2017).

12. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, podemos concluir que o fotobiomodulação aplicado no pedículo vascular de retalhos cutâneos reduz significativamente as citocinas pró inflamatórias e aumenta de forma significativa a expressão de citocinas anti- inflamatórias. Histologicamente pudemos comprovar uma significativa redução de células inflamatórias de permeio e diminuição do grau de destruição celular nos retalhos de todos os grupos submetidos à fotobiomodulação em todos os tempos estudados em comparação com o grupo controle. Corroborando ainda mais a tese do efeito protetor do laser sobre os retalhos.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arruda, E.; Rodrigues, N.; Taciro, C. et al. “Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia”. **Rev. Bras. Fisioter**, vol. 11, n. 4, pp.283-288, 2007.

Avci, P.; Gupta, A.; Sadasivam, M. et al. “Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring”. **Semin Cutan Med Surg**, 32 (1), pp. 41-52, 2013.

Ballestín, A.; Casado, J. G.; Abellán, E. et al. “Ischemia-reperfusion injury in a rat microvascular skin free flap model: a histological, genetic, and blood flow study”. **PLoS One**, 13 (12), pp. 1–16, 2018.

Cai, Y.; Yu, Z.; Yu, Q. et al. “Fat Extract Improves Random Pattern Skin Flap Survival in a Rat Model”. **Aesthetic Surg. J**, 39 (12), 2019.

Calis, M.; Demirtas, T. T.; Sert, G. et al. “Photobiomodulation with polychromatic light increases zone 4 survival of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap”. **Lasers Surg. Med**, 51 (6), pp. 538–549, 2019.

Corazza, A. V.; Jorge, J. et al. “Photobiomodulation on the Angiogenesis of Skin Wounds in Rats Using Different Light Sources”. **Photomed. Laser Surg**, 25 (2), pp. 102-106, 2007.

Dungel, P.; Hartinger, J.; Chaudary, S. et al. “Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing”. **Lasers Surg. Med**, 46 (10), pp. 773-780, 2014.

Esteves Jr., I.; Masson, I. B.; Oshima, C. T. F. et al. “Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats”. **Lasers Med. Science**, v. 27, n. 3, pp. 655-660, 2012.

Fang, M. J.; Qi, C. Y.; Chen, X. Y. et al. “Effects of batroxobin treatment on the survival

of random skin flaps in rats”. **Int. Immunopharmacol**, v. 72, pp. 235–242, 2019.

Freitas, L. F.; Hamblin, M. R. “Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy”. **IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron**, 22 (3), pp. 1–37, 2016.

Gavish, L.; Asher, Y. et al. “Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein”. **Lasers Surg. Med**, 35 (5), pp. 369-376, 2004.

Gemperli, R.; Munhoz, A. M. “The influence of type of vascular pedicle occlusion on the viability of skin island flaps: a postoperative quantitative assessment of flap survival in an experimental model in rats”. **Acta Cir. Bras**, v. 28, n. 7, pp. 487-493, 2013.

Hamblin, M. R. “Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation”. **AIMS Biophys**, 4 (3), pp. 337–361, 2017.

Hersant, B.; SidAhmed-Mezi, M.; et al. “Current Indications of Low-Level Laser Therapy in Plastic Surgery: a review”. **Photomed. Laser Surg**, 33 (5), pp. 283–297, 2015.

Karu, T. I. “Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation”. **Photochem Photobiol**, 84 (5), pp. 1091–1099, 2008.

Kilík, R.; Lakyová, L. Sabo, J. et al. "Effect of Equal Daily Doses Achieved by Different Power Densities of Low-Level Laser Therapy at 635 nm on Open Skin Wound Healing in Normal and Diabetic Rats". **BioMed Research International**, Article ID 269253, 2014.

Kubota, J. “Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model”. **Lasers Med. Sci**, 17 (3), pp. 146–153, 2002.

Leite, G.; Neves, L. et al. “Photobiomodulation laser and pulsed electrical field increase the viability of the musculocutaneous flap in diabetic rats”. **Lasers Med. Sci**, v. 32, n.

3, pp. 641-648, 2017.

Liu, J.; Cai, G.; Wang, S. et al. "The characteristics and risk factors for cisplatin-induced acute kidney injury in the elderly". **Ther. Clin. Risk Manag**, Volume 14, pp. 1279–1285, 2018.

Lucas, J. B. "The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps". **Facial Plast. Surg. Clin. North Am**, 25 (3), pp. 303–311, 2017.

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**, Volume 35, pp. 177-182, 1965.

Mao, Y.; Li, H.; Ding. et al. "Comparative Study of Choke Vessel Reconstruction With Single and Multiple Perforator–Based Flaps on the Murine Back Using Delayed Surgery". **Annals of Plastic Surgery**, 82 (1), pp. 93-98, 2019.

Martignago, C.; Tim, C. R.; Neves, L. M. et al. "Effect of two laser photobiomodulation application protocols on the viability of random skin flap in rats". **Optical Interactions with Tissue and Cells XXIX**, Volume 35, 2018.

Martignago, C. C. S; Tim, C. R.; Assis, L. et al. "Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats". **Lasers Med Sci**, 34 (5), pp. 1041-1047, 2019.

Moon, J. H.; Rhee, Y. H.; Ahn, J. C. et al. "Enhanced survival of ischemic skin flap by combined treatment with bone marrow-derived stem cells and low-level light irradiation". **Lasers Med. Sci**, Volume 33, pp. 1–9, 2018.

Neves, L. M. S.; Leite, G.; Marcolino, A. M. et al. "Laser photobiomodulation (830 and 660 nm) in mast cells, VEGF, FGF, and CD34 of the musculocutaneous flap in rats submitted to nicotine". **Lasers Med. Sci**, 32 (2), pp. 335-341, 2017.

Otterço, A. N.; Andrade, A. L. et al. "Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats". **J. Photochem. Photobiol. B Biol**, Volume 183, pp. 22–29, 2018.

Pinfildi, C. E.; Hochman, B. S.; Nishioka, M. A. et al. "What is better in TRAM flap survival: LLLT single or multi-irradiation?" **Lasers Med. Sci**, Volume 28, pp. 755–761, 2013.

Prado, R. P.; Liebano, R. E. et al. "Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats". **Acta Cir. Bras**, Volume 21, pp. 258–62, 2006.

Prado, R. P.; Pinfildi, C. E. et al. "Effect of Application Site of Low-Level Laser Therapy in Random Cutaneous Flap Viability in Rats". **Photomedicine and Laser Surgery**, 27(3), pp. 411–416, 2009.

Prado, R. P.; Garcia, S. B. et al. "Effects of 830 and 670nm Laser on Viability of Random Skin Flap in Rats". **Photomedicine and Laser Surgery**, 30(8), pp. 418–424, 2012.

Rojas, J. M.; Avia, M. et al. "IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections". **J. Immunol. Res**, Article ID 6104054, 2017.

Silva, E.; Gomes, S.; et al. "Histological evaluation of the effects of LLLT on the epithelial, connective and osseous tissue healing: experimental study in rats". **Rev Sul Bras Odontol**, 4 (2), pp. 29-35, 2007.

Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. "IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease". **Cold Spring Harb. Perspect. Biol**, volume 6, 2014.

Taylor GI, Caddy CM, Watterson PA, Crock, JG. "The venous territories (venosomes) of the human body: experimental study and clinical implications". **Plast Reconstr Surg**. 1990;86:185-213.

Wada, A. “Influência da pressão negativa na sobrevivência de retalhos cutâneos ao acaso: estudo experimental em porcos”. **Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Zhou, K. L.; Zhang, Y. H.; Lin, D. S. et al. “Effects of calcitriol on random skin flap survival in rats”. **Sci. Rep.** Volume 6, pp. 1–10, 2016.

14. ANEXO

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Laser de Baixa Intensidade na Sobrevivência de Retalhos Cutâneos de Camundongos", protocolada sob o CEUA nº 5380040918 (ID 000089), sob a responsabilidade de **Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 14/11/2018.

We certify that the proposal "Effect of Low level Laser on Survival of ischemic skin flap in mice", utilizing 48 Isogenics mice (48 males), protocol number CEUA 5380040918 (ID 000089), under the responsibility of **Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 11/14/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 12/2018 a 12/2020 Área: [Medicina](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 8 semanas](#)

N: [48](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: O experimentos serão realizados no laboratório de biologia celular da Universidade Nove de Julho.

São Paulo, 25 de maio de 2021



Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho