

MARCELO RENATO MASSAHUD JUNIOR

**LASER DE BAIXA INTENSIDADE COM
MICROCORRENTE NA
CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATAS**

Trabalho Final de Conclusão de Curso,
apresentado à Universidade do Vale do Sapucaí,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Aplicadas à Saúde.

POUSO ALEGRE – MG

2016

MARCELO RENATO MASSAHUD JUNIOR

**LASER DE BAIXA INTENSIDADE COM
MICROCORRENTE NA
CICATRIZAÇÃO EM FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATAS**

Trabalho Final de Conclusão de Curso,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Magela Salomé

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Margarida Maria de Carvalho Resende

POUSO ALEGRE – MG

2016

UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ

**MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

Coordenador: Prof. Dr. Taylor Brandão Schnaider

**Linha de Atuação Científico - Tecnológica: Padronização de Procedimentos
e Inovações em Feridas.**

Massahud Junior, Marcelo Renato.

Laser de Baixa Intensidade com a Microcorrente na Cicatrização em Feridas Cutâneas em Ratas / Marcelo Renato Massahud Junior. – Pouso Alegre: UNIVÁS, 2016.
xii, 46f.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí, 2016.

Título em inglês: low intensity laser and microcurrent on the healing of cutaneous wounds in rats

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Magela Salomé

Coorientadora: Profa. Dra. Margarida Maria de Resende Carvalho

1. Lasers. 2. Cicatrização. 3. Estimulação elétrica transcutânea. I. Título.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa sós porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

“Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À minha esposa **ANA PAULA REZENDE SANDY MASSAHUD**, sem a qual não seria possível a realização dessa etapa.

Aos meus pais **MARCELO RENATO MASSAHUD** e **MÍRIAN DE CÁSSIA NAVES MASSAHUD**, pelo exemplo de vida pautados na honestidade e trabalho.

À minha filha **MARIA EDUARDA SANDY MASSAHUD**, amor incondicional, motivação de continuar sempre batalhando e sempre acreditando.

Aos meus colegas de turma, mais que amigos, uma grande família sempre incentivando nas dificuldades.

Aos acadêmicos do Curso de Fisioterapia, sobretudo **CARLA RAFAELA RAPOSO**, **DANIELA EIKO IBA** e **PAULA NAIARA LIMA**, sem as quais a realização desse trabalho seria impossível.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, **PROF. DR. GERALDO MAGELA SALOMÉ**, ORIENTADOR DO MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DA UNIVERSIDADE DO VALE DO VALE DO SAPUCAÍ, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicional, que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor.

À Professora Dra. **MARGARIDA MARIA DE CARVALHO RESENDE**, o meu sincero agradecimento pela coorientação neste trabalho. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo.

Aos **PROFESSORES DO MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**, obrigado pelo conhecimento que nos transmitiram e pela dedicação de vocês aos alunos deste curso. Vocês tornaram esta conquista possível.

Ao MÉDICO VETÉRINÁRIO **WELLINGTON DELFINO**, RESPONSÁVEL TÉCNICO DO BIOTERIO e aos técnicos **IVAN LÚCIO DE MELO** e **JOSÉ LOPES CHAVES NETO** pela prontidão, auxílio durante toda a pesquisa.

À Jornalista **CÍNTIA FERREIRA** pela elaboração do Protocolo de Cirurgia Experimental de Feridas Cutâneas em Ratos, pelo profissionalismo e prontidão.

Ao meu grande amigo **DIEGO GUIMARÃES OPPENHEIMER**, que ajudou ativamente em cada uma das etapas deste trabalho.

Aos meus **AMIGOS DO MESTRADO**, pelos momentos compartilhados. Foi bom poder contar com vocês!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsGa – Arseneto de Gáleo

ATP – Adenosina trifosfato

AutoCad – Software utilizado para criação de desenhos em 2 dimensões

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIWAHL – Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature

Cm – Centímetros

Cm² – Centímetros quadrado

HeNe – Hélio Neônio

H₂ – Hidrogênio

Hz – Hertz

INI – International Nursing Index

J/cm² – Joules por centímetros quadrados

Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

LLLT – Laser de baixa intensidade

LTTP – Laser de baixa intensidade

mA – micro amperes

Mediline - Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica)

MENS – Micro Electro Neuro Stimulation

mg/kg – miligramas por quilo

mg/ml – miligramas por mililitros

MG – Minas Gerais

ml – mililitros

mm – milímetros

Mw – Micro watts

mw/cm² – Nano watts por centímetros quadrados

Nm- nanômetro

O₂ – Oxigênio

Ph – Escala utilizada para definir se uma solução é ácida ou básica

Power laser – Laser de alta intensidade

Punch – Equipamento utilizado para demarcação na pele

Soft laser – Laser da baixa intensidade

Scielo – *Scientific Eletronic Library Online* (Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde)

SPSS- *Statistical Package for Social Sciences* (Software para análise estatística)

UNIVAS- Universidade do Vale do Sapucaí

W – Watts

μ a – Microampère

°C – Graus Centígrados

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição das ratas por grupo	6
---------------------------------------------------------	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo para demonstração da Aplicação do Laser 904Nm	9
Figura 2 – Demarcação dos quatro pontos da ferida para tratamento do laser	10
Figura 3 – Aplicação de Microcorrente modo automático	10
Figura 4 – Posicionamento dos eletrodos nas margens da ferida	11
Figura 5 – Demonstração da aplicação da cobertura na ferida com adesivo estéril	11
Figura 6 – Demarcação da tricotomia	12

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Média, Mediana, Desvio Padrão e Delta % das áreas das feridas nos grupos Laser, Microcorrente, Laser+Microcorrente e Controle	15
Tabela 2: Média e Delta % das áreas das feridas dos grupos Laser, Microcorrente, Laser+Microcorrente e Controle	16
Tabela 3: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Microcorrentes, Laser e Controle	17
Tabela 4: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Microcorrentes, Laser+Microcorrente e Controle	18
Tabela 5: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser, Laser+Microcorrente e Controle	18
Tabela 6: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Microcorrentes e Controle	19
Tabela 7: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser e Controle	19
Tabela 8: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser+Microcorrente e Controle	20

SUMÁRIO

Capítulos	Páginas
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1.CONTEXTO	1
2.OBJETIVOS	5
3.MÉTODOS	6
3.1 Tipo de Estudo	6
3.2 Local de Estudo	6
3.3 Sujeito da Pesquisa	6
3.4 Critérios de Inclusão	7
3.5 Critérios de Não Inclusão	7
3.6 Materiais	7
3.7 Ética do Procedimento Experimental	7
3.8 Procedimentos	8
3.8.1 Anestesia dos Animais	8
3.8.2 Realização da Ferida	8
3.8.3 Tratamento da Ferida	8
3.8.3.1 Higienização da Ferida	9
3.8.3.2 Aplicação da Laserterapia	9
3.8.3.3 Aplicação da Eletroterapia por Microcorrente	10
3.8.3.4 Grupo Controle	11
3.8.3.5 Cobertura da Ferida	11
3.8.3.5 Tricotomia dos Pelos dos Animais	12
3.9 Coleta de Dados	12
3.10 Eutanásia dos Animais	13
3.11 Análise de Dados	13
3.12 Construção do Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em Ratas	13
4.RESULTADOS	15
5.PRODUTO	21
6.APLICABILIDADE	35
7.CONCLUSÃO	38
8.IMPACTO SOCIAL	39
9.REFERENCIAS	40
FONTES CONSULTADAS	45
ANEXO A: Parecer de Aprovação do CEUA	46

RESUMO

O Laser de baixa intensidade e a Microcorrente são recursos existentes no mercado com indicação para acelerar o processo de cicatrização de feridas. **Objetivos:** Avaliar os efeitos isolados e associados do laser de baixa intensidade Arseneto de Gálio (AsGa) com 904nm (vermelho) e da microcorrente no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratas, e a construção de um Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em Ratos **Métodos:** Estudo longitudinal, prospectivo, descritivo, analítico, experimental, intervencional, controlado e randomizado, o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS), sob o parecer número 208/2014. Fizeram parte do estudo 48 ratos *winstar* provenientes do biotério da UNIVÁS, que foram submetidos a cirurgia para confecção de ferida cutânea no dorso com um *punch* metálico de 2,13 cm² de área, logo após foram divididos randomicamente em 4 grupos, Grupo Laserterapia, com Laser de baixa intensidade AsGa 904nm a 4J/cm², Grupo Microcorrente, com microcorrente modo automático, a 80 miliampéres, 60 Hz por 12 minutos, Grupo Laserterapia + Microcorrente, seguindo os mesmos parâmetros dos grupos laserterapia e microcorrente, e Grupo Controle, sem tratamento, submetidos a tratamento diário por 21 dias consecutivos, Em todos os grupos após o tratamento a ferida era coberta por gel carbopol e filme adesivo. Foram realizadas avaliações da área das feridas nos dias 0, 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 15^o, 18^o e 21^o dias. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Qui Quadrado para realizar a comparação entre os quatro grupos e para avaliar o percentual de cicatrização de cada ferida foi utilizado o teste de Delta %. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de $p < 0.05$. **Resultados:** Os animais do Grupo Laserterapia obtiveram uma melhor cicatrização da ferida (0,0056cm², $P < 0,0001$), seguidos pelos grupos de Laserterapia + Microcorrente (0,0084cm², $P < 0,0001$), Microcorrente (0,0109cm², $P: 0,0004$) e por último Grupo Controle (0,0197cm²). **Conclusão:** conclui-se que a laserterapia foi mais eficaz na regressão de feridas cutâneas em ratas.

Descritores: Lasers, Cicatrização, Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea.

ABSTRACT

The laser of low intensity and the microcurrent are existing features on the market with an indication to accelerate the wound healing process. Objectives: To evaluate the isolated effects and associated low intensity laser Gallium Arsenide (GaAs) to 904nm (red) and microcurrent on the healing process of skin wounds in rats, and the construction of an Experimental Surgery Protocol Wound Surgery in rats Methods: a longitudinal study, prospective, descriptive, analytical, experimental, interventional, controlled, randomized study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the University of Sapucaí Valley (UNIVÁS), under number 208 / 2014. The subjects were 48 rats Wistar from the vivarium of UNIVÁS, who underwent surgery for making skin wound on the back with a metal punch of 2.13 cm² area, shortly after were randomly divided into 4 groups, Laser Therapy Group, with low level laser GaAs 904nm to 4 J / cm², microcurrent Group, with microcurrent automatic mode, 80 milliamps, 60 Hz for 12 minutes, Laser Therapy + microcurrent Group, following the same parameters of the groups laser therapy and microcurrent, and control group without treatment, undergoing daily treatment for 21 consecutive days in all groups after treatment the wound was covered with gel carbopol and adhesive film. of wound area evaluations were performed on days 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 days. We used the Kruskal-Wallis Test, Mann-Whitney and Chi Square for performing the comparison between the four groups and to evaluate the percentage of healing of each wound was used Delta% test. For all analyzes was considered the significance level of $p < 0.05$. Results: Animals in the laser therapy group achieved a better wound healing (0,0056cm², $P < 0.0001$), followed by groups of laser therapy + microcurrent (0,0084cm², $P < 0.0001$), Microcurrent (0,0109cm², $P: 0.0004$) and last control group (0,0197cm²). Conclusion: it is concluded that laser therapy was more eficaz in the regression of skin wounds in rats.

Keywords: Lasers, Healing, Transcutaneous Electric Nerve Stimulation.

1. CONTEXTO

A pele é o maior órgão do corpo, indispensável para a vida humana e fundamental para o perfeito funcionamento fisiológico do organismo. Como qualquer outro órgão está sujeito a sofrer agressões oriundas de fatores patológicos intrínsecos e extrínsecos, que irão causar o desenvolvimento de alterações na sua constituição como, por exemplo, as feridas cutâneas. Quando estas agressões causam lesão, que leva a solução de continuidade da pele, definimos como ferida (DECLAIR, 2002).

O profissional cuidador de pacientes com feridas cutâneas desempenha um papel fundamental pelo trabalho de extrema relevância que executa. Exercem abordagem holística do paciente; acompanha a evolução da lesão, orienta e realiza o curativo, detendo o domínio técnico. (TUYAMA *et al.*, 2004; SALOMÉ & EXPOSITO, 2008; GARDONA *et al.*, 2014; ALMEIDA, MOREIRA, SALOME, 2014)

O tratamento das feridas é dinâmico e depende a cada momento da evolução das fases de cicatrização. Atualmente são inúmeras as opções de coberturas e tratamentos adjuvantes existentes no mercado, por exemplo: coberturas com novas tecnologias, tratamento por fitoterápico, tratamento adjuvante através da câmara hiperbárica, laser, ultrassom, corrente farádica e outros.

Os recursos financeiros do paciente ou da unidade de saúde, a necessidade de continuidade da utilização do curativo, inclusive domiciliares, e a avaliação de benefícios e custos são alguns dos aspectos a serem considerados no momento da escolha do tipo de tratamento e cobertura, que devem ser adequados à natureza, à localização e ao tamanho da lesão. Embora haja grande variedade de tratamento coadjuvante e coberturas, um só tipo de cobertura não preenche os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas, sendo muitas vezes necessária a utilização de tratamento adjuvante (FRANCO & GONÇALVES, 2008, SANTOS, *et al.*, 2013).

A utilização do laser de baixa intensidade possui eficácia no processo de regeneração celular, sendo utilizada na busca de cicatrização mais rápida e no proporcionamento de melhores condições à ferida. Sua eficiência deve-se às particularidades de respostas que induzem nos tecidos, diminuindo o edema, o processo inflamatório e aumentando a síntese de colágeno e a epitelização (PIERI, 2009).

A palavra laser significa, em inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que em português significa amplificação de luz por uma emissão estimulada de radiação, podendo ser classificado de duas maneiras: o *power laser* (de alta intensidade) e o *soft laser* (de baixa

intensidade). Os de baixa intensidade são utilizados na área de fisioterapia, como também, no tratamento das úlceras (PIERI, 2009).

As propriedades terapêuticas do laser são estudadas desde a proposição da teoria da emissão estimulada por Albert Einstein, em 1917, sendo sugerida pela primeira vez em 1957, por dois cientistas americanos, Charles Townes e Arthur Achawlow, tornando-se realidade em 1960, com a construção do primeiro emissor de laser, a Rubi, por Theodore Maiman (HENRIQUES, CAZAL, CASTRO, 2010).

Estudos publicados sobre o uso da terapia laser de baixa potência abriram nova fronteira para o tratamento clínico de muitas desordens. Visto que o mesmo começou a ser utilizado no processo de regeneração e recuperação funcional de lesões nervosas periféricas na década dos anos 1970, havendo vários relatos e divergências sobre os resultados obtidos (REIS *et al.*, 2008; ABRAMOFF *et al.*, 2014; WOLFENSON *et al.*, 2015).

A radiação gerada pelos aparelhos de laser de uso terapêutico difere da radiação gerada por outras fontes em três aspectos: 1) Monocromaticidade, que descreve uma radiação que demonstra espectrograficamente, só uma linha; 2) Coerência, que se refere à organização perfeita no que diz respeito ao deslocamento ordenado de suas ondas que oscilam uniformemente, ou seja, todas as ondas estão na mesma fase e esta coerência espacial contribui para manter a potência luminosa do feixe por não haver interferência entre os raios; 3) Polarização, onde os feixes são paralelos, sem catraca da cremalheira divergência e com elevada colimação. Isto permite seu direcionamento para um ponto determinado com mínima dispersão, possibilitando o foco em diâmetros muito pequenos sem perda da intensidade conforme sua distância. (AGNE, 2005; AQUINO, 2005)

A interação da radiação do laser com os tecidos se realiza nas interfaces, mediante os fenômenos de reflexão e refração e, no interior do meio, onde tem lugar a transmissão, fato que depende principalmente dos fenômenos de absorção e dispersão, sendo que a dispersão e a transmissão da radiação a laser dependem fundamentalmente de dois fatores: o comprimento de onda e a natureza absorvente (AGNE, 2005).

A utilização da corrente elétrica com o objetivo de promover a cicatrização de feridas não é algo revolucionário ou novo, pois há registros de mais de 300 anos de sua utilização por meio de lâminas de ouro no tratamento de lesões cutâneas provocadas pela varíola (GUIRRO, 2002).

A microcorrente é uma modalidade de terapia não invasiva que usa corrente de baixa amperagem, em microampères (μA) com alternância de polaridade positiva e negativa a cada 3 segundos. Seus efeitos terapêuticos relacionam-se ao aumento do metabolismo celular, estímulo do

processo de reparo e regeneração tecidual, normalização do pH local, aumento da síntese de proteínas (colágeno e elastina). Promove a revitalização e o rejuvenescimento da pele (GUIRRO, 2002).

Segundo Robinson & Snyder-Mackler (2001) o modo normal de aplicação dos aparelhos de microcorrentes ocorre em níveis que não se consegue ativar as fibras nervosas sensoriais subcutâneas e, como resultado, os pacientes não têm nenhuma percepção da sensação de formigamento tão comumente associada com procedimentos eletroterapêuticos.

Starkey (2001), relata que esta forma de estimulação elétrica tende a ser aplicada em nível sub-sensorial ou sensorial muito baixo, com uma corrente que opera a menos que 1000 microampères. As microcorrentes trabalha com a menor quantidade de corrente elétrica mensurável e isso é compatível com o campo eletromagnético do corpo (BORGES, 2006).

Efeitos da Estimulação Elétrica por Microcorrentes são o aumento da produção de ATP em até 500%, aumento da síntese de proteínas (colágeno e elastina), aumento na captação de O₂, aumento no transporte de aminoácidos e aumento do transporte de membranas (BORGES, 2006):

A microcorrente acelera em até 500% a produção do Trifosfato de adenosina (ATP), sendo essa molécula a grande responsável pela síntese proteica e regeneração tecidual devido a sua participação em todos os processos energéticos da célula.

A MENS (*Micro Electro Neuro Stimulation*) é indicada para cicatrização, pós-operatórios, rejuvenescimento da pele, flacidez tissular, recuperação de queimaduras, inovação cutânea (aumento do número de fibroblastos e alinhamento das fibras colágenas, potencializa a circulação linfática, diminuindo o edema), estrias, eliminação de metabólicos celulares (BORGES, 2006).

A aplicação dessa técnica pode ser realizada de duas formas: manual e automática. Na aplicação manual, o profissional movimentava lentamente dois eletrodos tipo caneta previamente umedecida. Ela é mais indicada para pessoas que dispõem de mais tempo e que necessitam de uma atenção especial, por exemplo, pessoas em fase de *stress*.

Já a aplicação automática consiste na colocação de eletrodos fixos em pontos predeterminados da superfície corporal, com conseqüente escolha de um programa mais adequado para o caso a tratar. Nesses casos, por se tratar de uma terapia mais rápida foi o modo escolhido para a realização do presente estudo.

Apesar de muito utilizadas não existem estudos comparativos dessas duas modalidades terapêuticas no processo de cicatrização de feridas cutâneas produzidas em ratos, portanto, justificase a necessidade dessa comparação de estudo.

As pesquisas experimentais são importantes a medida que auxiliam na compreensão dos processos naturais da evolução das mais diferentes patologias e apontam para a melhor intervenção na medida que preservam a vida humana e sua integridade física e mental. Conseguir um grupo homogêneo com número suficientes de indivíduos também é uma dificuldade encontrada por pesquisadores que reforçam a necessidade de se utilizar modelos animais em pesquisas. Sem contar o abandono da pesquisa e a dificuldade de se acompanhar grandes grupos em pesquisas com longas durações.

Estabelecer critérios mínimos para a utilização animal em pesquisa seguindo os princípios da bioética, biossegurança e preocupação com o bem estar animal é fundamental ao pesquisador que utiliza-se das pesquisas experimentais.

Ainda que seja um processo comum e antigo existem poucos manuais ou protocolos que descrevem o processo experimental de confecção de ferida cutânea em ratos, há muitas diferenças entre os métodos utilizados em diferentes trabalhos no que se referem a acomodações, anestesia, epilação e tricotomia, procedimento cirúrgico, eutanásia e descarte, o que justifica a criação de tal protocolo.

2- OBJETIVOS

Avaliar os efeitos isolados e associados do Laser de baixa intensidade AsGa com 904nm (vermelho) e das microcorrentes, no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratas.

Construir protocolo de cirurgia experimental para ferida cirúrgica em ratos.

3. MÉTODOS

3.1. Tipo de Estudo

Estudo Longitudinal, prospectivo, descritivo, analítico, experimental, intervencional, controlado e randomizado.

3.2. Local do Estudo

A pesquisa foi realizada no Centro de Cirurgia Experimental José Manoel Lopes da Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre - MG.

3.3 Sujeito da Pesquisa

Fizeram parte do estudo 48 ratas (*Rattus Norvegicus albinus, Rodentia mammalia*) albinos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério e Centro de Cirurgia Experimental José Manoel Lopes da UNIVAS, sendo distribuídas em 4 grupos com 12 ratas em cada grupo, especificados a seguir (quadro 1)

Quadro 1- Distribuição das ratas por grupo.

Grupos	Tipo de tratamento	Nº de ratas
Laser	Laserterapia de baixa intensidade 904nm.	12
Micro	Eletroterapia com Microcorrente	12
Laser + Micro	Laserterapia de baixa intensidade 904nm associada a Eletroterapia com Microcorrente	12
Controle	Controle	12

Antes do experimento as ratas ficaram por um período de adaptação de 10 dias em gaiolas de polipropileno, contendo um animal por gaiola, com ciclo claro e escuro de 12 horas em sala com controle de exaustão, com ração padrão do biotério *ad libitum* e água *ad libitum*. Durante o experimento as ratas permaneceram nestas mesmas condições.

3.4 Critérios de inclusão

Foram incluídas Ratas Wistar fêmeas de idade entre 2 a 3 meses, com peso entre 200 a 300 gramas, sem malformação e eutróficas.

3.5 Critérios de não inclusão

Machos

Fêmeas com peso inferior a 200 gramas e superior a 300 gramas.

3.6 Materiais

- Aparelho de laser de baixa intensidade, comprimento de onda de 904nm a 30 mW/cm² de potência, da marca Laserpulpe®, da empresa IBRAMED.
- Aparelho de eletroterapia, com Microcorrentes Neurodyn Multicorrentes IBRAMED
- Ração padrão ad libidum e água para alimentação das ratas.
- Cloridrato de xilazina 2%
- Cloridrato de cetamina 5%
- Filme adesivo transparente - Opsite®
- Instrumento metálico circular cortante (tipo *PUNCH*), confeccionado para este fim.
- Extrato glicólico de gel de carbopol 100%

3.7 Ética do Procedimento experimental

Projeto aprovado pelo CEUA (Comissão Ética no Uso de Animais) da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVAS) sob protocolo 208/14 (Anexo 1)

3.8 Procedimentos

3.8.1 Anestesia dos animais

Para o procedimento cirúrgico da produção da ferida as ratas foram submetidas à anestesia geral com injeção intra-muscular Cloridrato de cetamina (100 mg/kg) 85 mg/kg de peso associada a Cloridrato de xilazina (20 mg/kg), 2,0 mg/kg de peso .

3.8.2 Realização da Ferida

Após a anestesia foi realizada a epilação por tração digital de uma área de 4 x 6cm com seu centro na linha mediana dorsal iniciada na margem inferior da escápula. Após foi feita a antissepsia da área epilada com solução de gluconato de clorexidina a 2%. Foi demarcada área da rescisão da pele para produção da ferida no plano transversal, com seu centro na linha mediana dorsal seguindo em sentido caudal, iniciando-se a 1,0cm da margem inferior da escápula, por uma excisão cirúrgica da pele em forma circular de 2 cm de diâmetro, com auxílio de um *punch* de 2,13mm de diâmetro. Realizou-se em seguida a exérese da pele até a fáscia muscular, com bisturi número 15. Após a cirurgia os animais receberam 0,1mg para cada grama de peso de paracetamol (Tylenol®200mg/ml) por via oral, para analgesia pós-operatória, esse medicamento foi diluído em 250 ml de água na dose para 24 horas e administrado aos animais, junto à hidratação *ad libitum*. A seguir foi iniciado o tratamento em cada grupo de ratas de acordo com objetivo proposto.

3.8.3 Tratamento da ferida

O tratamento foi realizado diariamente, sempre no mesmo horário, durante 21 dias seguidos. As feridas receberam o tratamento conforme descrição a seguir.

3.8.3.1. Higienização da Ferida

Antes do tratamento a ferida foi higienizada com 20 ml de soro fisiológico aquecido a 35°C, por meio de seringa de 20 ml cloreto de sódio a 0,9% aplicado, com um jato contínuo, diretamente na superfície da mesma e foi seca com uma gaze estéril dobrada em quatro partes.

3.8.3.2 Aplicação da Laserterapia

O laser adotado para o tratamento das lesões foi o Laser de baixa intensidade AsGa (Arseneto de Gálio) com 904nm (vermelho), com potência de 30mW e dose de 4J/cm², como no modelo da figura 1.



Figura 1: Modelo para demonstração da aplicação do laser 904nm

O laser foi aplicado de forma pontual, em 4 pontos na margem da ferida previamente demarcados distantes um do outro em um cm como no modelo a seguir. Cada ponto demarcado recebeu uma aplicação do Laser, a aplicação de cada ponto durou 30 segundos (Figura 2):

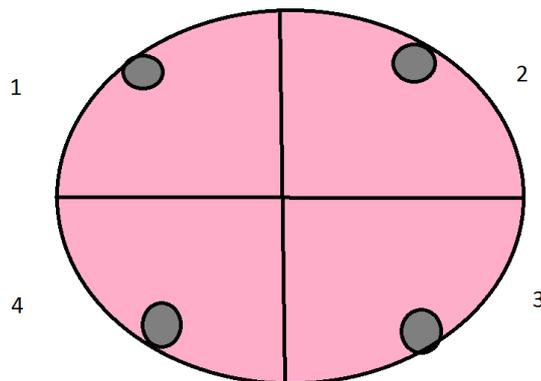


Figura 2: Demarcação dos quatro pontos da ferida para tratamento com laser

3.8.3.3 Aplicação da eletroterapia por microcorrente

O aparelho utilizado para a eletroterapia por microcorrente foi o Neurodyn Multicorrentes da fabricante IBRAMED. Sua aplicação foi realizada diariamente por 21 dias, sempre no mesmo horário. Modo de aplicação automático, com intensidade de 80 miliampéres (μA), frequência de 60Hz durante 12 minutos. (Figura 3).

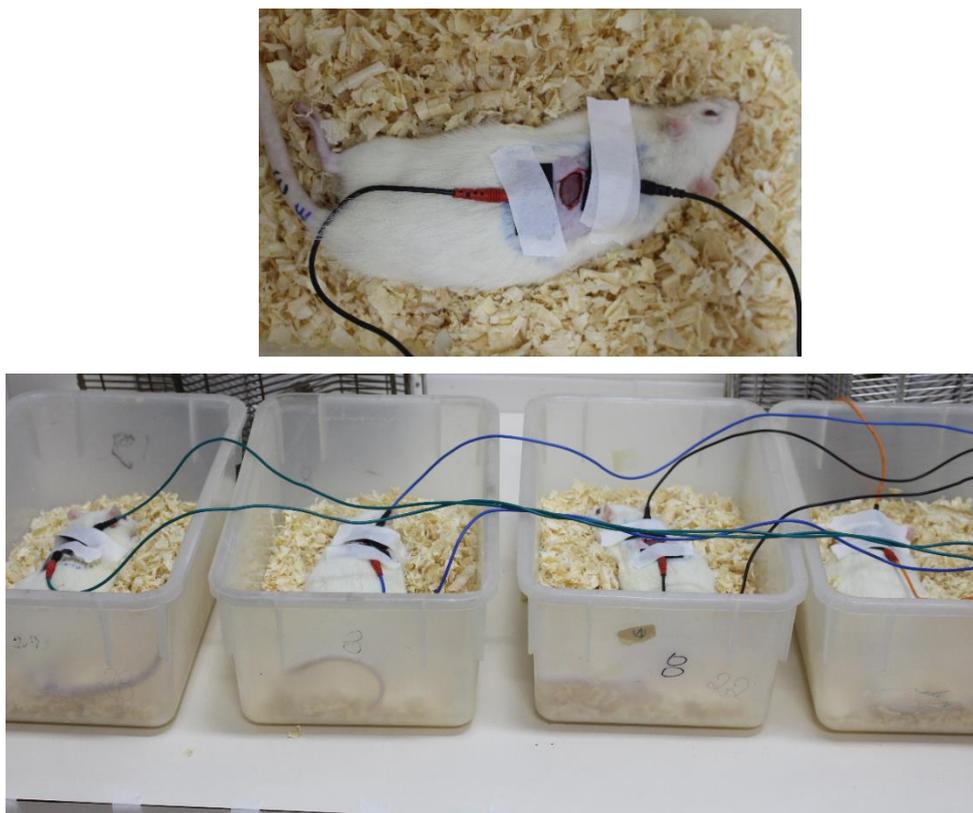


Figura 3: Aplicação de Microcorrente modo automático

Para a aplicação foram utilizados 2 (dois) eletrodos, para uso individual de silicone cortados ao tamanho de 300x150 mm, que foram acoplados na margem caudal e cranial da ferida, utilizou-se gel de carbopol como meio de transmissão da corrente elétrica. (Figura 4)

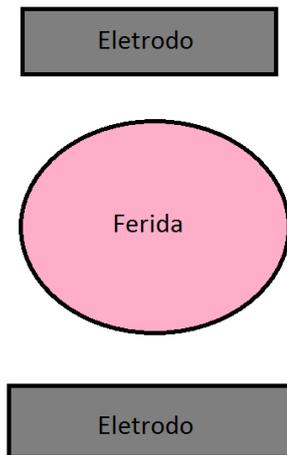


Figura 4 – Posicionamento dos eletrodos nas margens da ferida

3.8.3.4 Grupo Controle

Os animais do grupo controle foram submetidos a aplicação uma camada de gel de carbopol a 100%.

3.8.3.5 Cobertura da Ferida

Após a aplicação do tratamento de cada grupo a ferida foi coberta por uma camada de gel de carbopol a 100%, sobre o gel, utilizou-se adesivo filme de Opsite® se estendendo na região na qual foi realizada a tricotomia como no exemplo a seguir (Figura 5):



Figura 5 – Demonstração da aplicação da cobertura na ferida com adesivo estéril

3.8.3.6 Tricotomia dos pelos dos Animais

A cada 5 dias, a área epilada de 4x6 cm, recebia nova tricotomia com exceção de uma faixa de 0,5 cm ao redor da ferida.

A finalidade deste procedimento era não promover micro traumas desta região para não interferir na cicatrização da ferida, assim como, possibilitar a adesão do filme adesivo protetor do curativo, somente na região epilada (Figura 6):

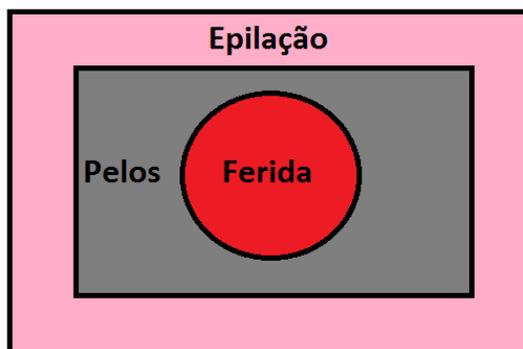


Figura 6. Demarcação da tricotomia

3.9 Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada por meio de planimetria da área da ferida, em 8 momentos de avaliação (CARVALHO *et al.*, 2006). A primeira avaliação aconteceu logo após o ato cirúrgico no dia 0^o e as demais nos dias 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 15^o, 18^o e 21^o dias. A medida da área da ferida foi realizada por através de um decalque do perímetro. Utilizou-se dois filmes de polipropileno estéreis, colocados de forma a ficarem sobrepostos sobre a ferida. Por meio de um pincel de ponta fina e tinta indelével, realizou-se o contorno da ferida, seguindo suas margens. Logo após, o filme que ficou em contato com a ferida foi dispensado e o outro foi escaneado e utilizado para a aferição da área por meio do programa AutoCad.

3.10 Eutanásia dos Animais

No 21^o dia, após a ressecção da pele para exame histológico os animais foram induzidos à eutanásia por injeção de cloreto de potássio a 10% no mediastino. Os corpos dos ratos foram

descartados em saco de lixo infectante e encaminhados para o abrigo de lixo infectante, guardados em geladeira até a coleta externa.

3.11 Análise dos dados

Os dados foram registrados na forma de banco de dados do programa de informática SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows 15.0, onde foi comparada a evolução das áreas das feridas nos sete momentos, entre todos os grupos estudados.

Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para realizar a comparação entre os quatro grupos. Para comparar dois e/ou três grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para avaliar o percentual de cicatrização de cada ferida foi utilizado o teste de Delta %, cálculo Qui-Quadrado afim de conduzir um teste de qualidade de ajustamento, para mostrar se existe de fato diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens das áreas das feridas e se a amostra se adequa aos resultados obtidos. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

3.12 Construção do Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em ratos.

O desenvolvimento dessa pesquisa gerou um produto; o “Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em Ratos”. Foi realizada revisão junto às bases de dados das Ciências da Saúde como a Biblioteca Cochrane, SCIELO, (*Scientific Electronic Library Online*), LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciência da Saúde), a MEDLINE (*National Library of Medicine-USA*), *International Nursing Index* (INI) e o *Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL), além de consultar livros e teses da área dos últimos 10 anos. Assim, após a realização de ampla pesquisa bibliográfica em periódicos indexados nacionais e internacionais citados acima e após lermos os resumos, foram selecionados os artigos que descreviam a definição de manual, cirurgia experimental, cirurgia em ratos, protocolo cirurgia experimental. (SCHANAIDER, SILVA, 2004; FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA *et al.*, 2005; SCHNAIDER, 2008; JR EDVALDO, ALVES, ROCHA, 2012).

A partir deste levantamento elaborou-se o protocolo, que foi composto por sequência descrita em 3 (três) etapas:

- Primeira etapa: Descrição as técnicas de acomodação, manuseio, anestesia, confecção da ferida, demarcação com *punch* e epilação dos pelos.

- Segunda etapa: Confeção da Ferida
- Terceira etapa: Padronização da técnica de limpeza e do curativo.
- Quarta etapa: Padronização da técnica de eutanásia.
- Quinta etapa: Padronização do descarte de carcaças

4- RESULTADOS

Pela avaliação da planimetria observou-se que, de todos os grupos, os animais submetidos ao tratamento com laserterapia foram os que apresentaram maior regressão das feridas.

Quando associados os tratamentos de microcorrente com laser, foi possível observar que este obteve resultado inferior ao laser e superior à microcorrente.

Para todos os quatro tratamentos obteve-se um p-Valor menor que o nível de significância $\alpha = 0,05$ adotado, o que leva à rejeição da hipótese nula de que as porcentagens não apresentam diferença estatística. Conclui-se, a partir do teste Qui-Quadrado de Adequação do Ajustamento, que as porcentagens de fato são diferentes para cada etapa dos tratamentos e a quantidade de porcentagens consideradas para o teste são suficientes para se chegar a essa conclusão, Tabela 1.

Tabela 1 – Média, Mediana, Desvio Padrão e Delta % das áreas das feridas dos grupos Laser, Microcorrente, Laser+Microcorrente e Controle.

Dias	Grupos															
	Micro				Laser				Laser + Micro				Controle			
	Média	Mediana	Desvio padrão	Delta %	Média	Mediana	Desvio padrão	Delta %	Média	Mediana	Desvio padrão	Delta %	Média	Mediana	Desvio padrão	Delta %
3	2,04	2,00	0,34	20,23	2,16	2,27	0,44	22,04	2,04	1,97	0,54	36,38	2,03	2,05	0,39	34,84
6	1,65	1,61	0,31	35,39	1,55	1,50	0,29	43,21	1,71	1,66	0,49	46,57	1,39	1,42	0,36	55,28
9	0,89	0,84	0,37	64,40	0,86	0,88	0,29	66,60	0,71	0,61	0,20	77,80	0,57	0,57	0,14	81,38
12	0,41	0,31	0,23	83,01	0,23	0,23	0,07	91,22	0,28	0,24	0,09	90,93	0,30	0,27	0,15	90,11
15	0,20	0,15	0,14	91,59	0,11	0,12	0,03	95,82	0,12	0,11	0,02	96,15	0,15	0,12	0,08	94,79
18	0,09	0,09	0,03	96,15	0,04	0,04	0,02	98,36	0,05	0,05	0,01	98,24	0,07	0,07	0,02	97,46
21	0,01	0,00	0,00	99,56	0,00	0,00	0,00	99,78	0,00	0,00	0,00	99,72	0,01	0,01	0,00	99,35
Estatística χ^2				84,21				77,61				52,57				46,13
Valor do p	< 0,0001				< 0,0001				< 0,0001				< 0,0001			

Teste de Qui-quadrado significância estatística $p \leq 0,05$

Comparando-se a área das feridas entre os quatro grupos, não apresentaram diferenças significantes quanto ao tamanho da ferida confeccionada. Quanto à regressão das feridas os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas a partir do 15º dia de observação, com o tratamento Laser apresentando melhores resultados, através de menores médias observadas, seguindo a tendência até o último dia de observações, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Média e Delta % das áreas das feridas dos grupos Laser, Microcorrente, Laser+Microcorrente e Controle.

Dias	Grupo								Valor do p
	Micro		Laser		Laser +Micro		Controle		
	Média	Delta %	Média	Delta %	Média	Delta %	Média	Delta %	
3	2,040	20,232	2,165	22,040	2,040	36,383	2,036	34,844	0,8770
6	1,653	35,399	1,552	43,217	1,716	46,570	1,390	55,287	0,2547
9	0,892	64,407	0,867	66,602	0,712	77,803	0,573	81,389	*0,0309
12	0,413	83,017	0,231	91,229	0,282	90,939	0,302	90,116	0,0803
15	0,203	91,598	0,110	95,827	0,121	96,158	0,157	94,791	*0,0215
18	0,094	96,159	0,040	98,360	0,054	98,242	0,076	97,467	*0,0001
21	0,010	99,568	0,005	99,781	0,008	99,720	0,019	99,357	* 0,0001

Test Kruskal-Wallis *Significância estatística $p \leq 0,05$

Comparação nos dias de coleta da regressão da área das feridas de todos os grupos.

Comparando os efeitos dos três grupos (laser, microcorrente e controle), o grupo Controle apresentou médias menores em cm^2 até o 9º dia do tratamento, sendo superado com significância estatística pelo tratamento Laser a partir dos resultados observados no 12º dia, seguindo a mesma tendência até o fim das observações, conforme podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos microcorrente, laser e controle.

Dias	Grupos									Valor do P
	Micro			Laser			Controle			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
3	2,040	2,009	0,345	2,165	2,271	0,449	2,036	2,057	0,399	0,6533
6	1,653	1,618	0,317	1,552	1,507	0,296	1,390	1,424	0,360	0,2290
9	0,892	0,848	0,379	0,867	0,885	0,296	0,573	0,576	0,141	0,0187
12	0,413	0,319	0,238	0,231	0,235	0,072	0,302	0,278	0,159	0,0415
15	0,203	0,159	0,144	0,110	0,123	0,035	0,157	0,129	0,087	0,0238
18	0,094	0,093	0,034	0,040	0,040	0,021	0,076	0,078	0,023	0,0001
21	0,010	0,009	0,003	0,005	0,005	0,001	0,019	0,019	0,004	< 0,0001

Kruskal-Wallis *Significância estatística $p \leq 0,05$

Comparando de forma isolada os grupos Microcorrente, Laser + Microcorrente e Controle, podemos observar uma maior regressão da área da ferida no grupo Laser + Microcorrente a partir do 15º dia de coleta de dados, seguindo a tendência até o final do tratamento.

Tabela 4: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas dos grupos Microcorrente, Laser+Microcorrente e Controle.

Dias	Grupos									Valor do p
	Micro			Laser + Micro			Controle			
	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
3	2,040	2,009	0,345	2,040	1,977	0,542	2,036	2,057	0,399	0,9769
6	1,653	1,618	0,317	1,716	1,666	0,497	1,390	1,424	0,360	0,1301
9	0,892	0,848	0,379	0,712	0,615	0,206	0,573	0,576	0,141	0,0612
12	0,413	0,319	0,238	0,282	0,248	0,097	0,302	0,278	0,159	0,2659
15	0,203	0,159	0,144	0,121	0,118	0,027	0,1573	0,129	0,087	0,0445
18	0,094	0,093	0,034	0,054	0,057	0,014	0,0766	0,078	0,023	0,0013
21	0,010	0,009	0,003	0,008	0,008	0,004	0,0197	0,019	0,004	< 0,0001

Kruskal-Wallis Significância estatística $p \leq 0,05$

Em comparação entre os grupos Laser, Laser + Microcorrente e Controle pode-se observar maior relevância estatística no grupo que recebeu tratamento com Laser sobre os grupos Laser + Microcorrente e grupo Controle a partir do 18º dia de coleta de dados.

No 9º dia de coleta foi verificada boa relevância nas amostras do grupo Controle, porém, essa relevância foi superada imediatamente pelos outros grupos e seguindo essa tendência até o final do tratamento, conforme pode-se observar na tabela 5.

Tabela 5: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser, Laser+Microcorrente e Controle.

Dias	Grupos									Valor do P
	Laser			Laser + Micro			Controle			
	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	Média	Mediana	Desvio padrão	
3	2,165	2,271	0,449	2,040	1,977	0,542	2,036	2,057	0,399	0,7764
6	1,552	1,507	0,296	1,716	1,666	0,497	1,390	1,424	0,360	0,2166
9	0,867	0,885	0,296	0,712	0,615	0,206	0,573	0,576	0,141	0,0193
12	0,231	0,235	0,072	0,282	0,248	0,097	0,302	0,278	0,159	0,5016
15	0,110	0,123	0,035	0,121	0,118	0,027	0,157	0,129	0,087	0,4114

18	0,040	0,040	0,021	0,054	0,057	0,014	0,076	0,078	0,023	0,0028
21	0,005	0,005	0,001	0,008	0,008	0,004	0,019	0,019	0,004	< 0,0001

Kruskal-Wallis significância estatística $p \leq 0,05$

A efetividade do tratamento Micro só pôde ser observada com significância estatística no 21º dia de observações, evidenciando pouca diferença entre o tratamento e os resultados observados no grupo Controle nos dias anteriores do experimento.

Tabela 6: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Microcorrentes e Controle.

Dias	Grupos						Valor do P
	Micro			Controle			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
3	2,040	2,009	0,345	2,036	2,05	0,399	0,7987
6	1,653	1,618	0,317	1,390	1,42	0,360	0,0887
9	0,892	0,848	0,379	0,573	0,57	0,141	0,0284
12	0,413	0,319	0,238	0,302	0,27	0,159	0,2656
15	0,203	0,159	0,144	0,157	0,129	0,087	0,2415
18	0,094	0,093	0,034	0,076	0,078	0,023	0,1332
21	0,010	0,009	0,003	0,019	0,019	0,004	0,0004

Mann Whitney significância estatística $p \leq 0,05$

Na comparação entre os resultados obtidos com o tratamento Laser e os observados no grupo Controle, o tratamento Laser apresentou resultados estatisticamente significativos a partir do 18º dia de coleta de dados, com boa margem de diferença e seguindo a tendência até o último dia de observações.

Tabela 7: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser e Controle.

Dias	Grupos						Valor do P
	Laser			Controle			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
3	2,165	2,271	0,449	2,036	2,057	0,399	0,4428
6	1,552	1,507	0,296	1,390	1,424	0,360	0,3473
9	0,867	0,885	0,296	0,573	0,576	0,141	0,0068

12	0,231	0,235	0,072	0,302	0,278	0,159	0,3776
15	0,110	0,123	0,035	0,157	0,129	0,087	0,1781
18	0,040	0,040	0,021	0,076	0,078	0,023	0,0011
21	0,005	0,005	0,001	0,019	0,019	0,004	< 0,0001

Mann Whitney significância estatística $p \leq 0,05$

Comparando-se os resultados do tratamento Laser + Micro com o grupo Controle, evidenciou-se com significância estatística que o tratamento apresentou diferenças a partir do 18º dia de observações, com menor área da ferida no grupo laser+micro, seguindo a mesma tendência até o final do estudo.

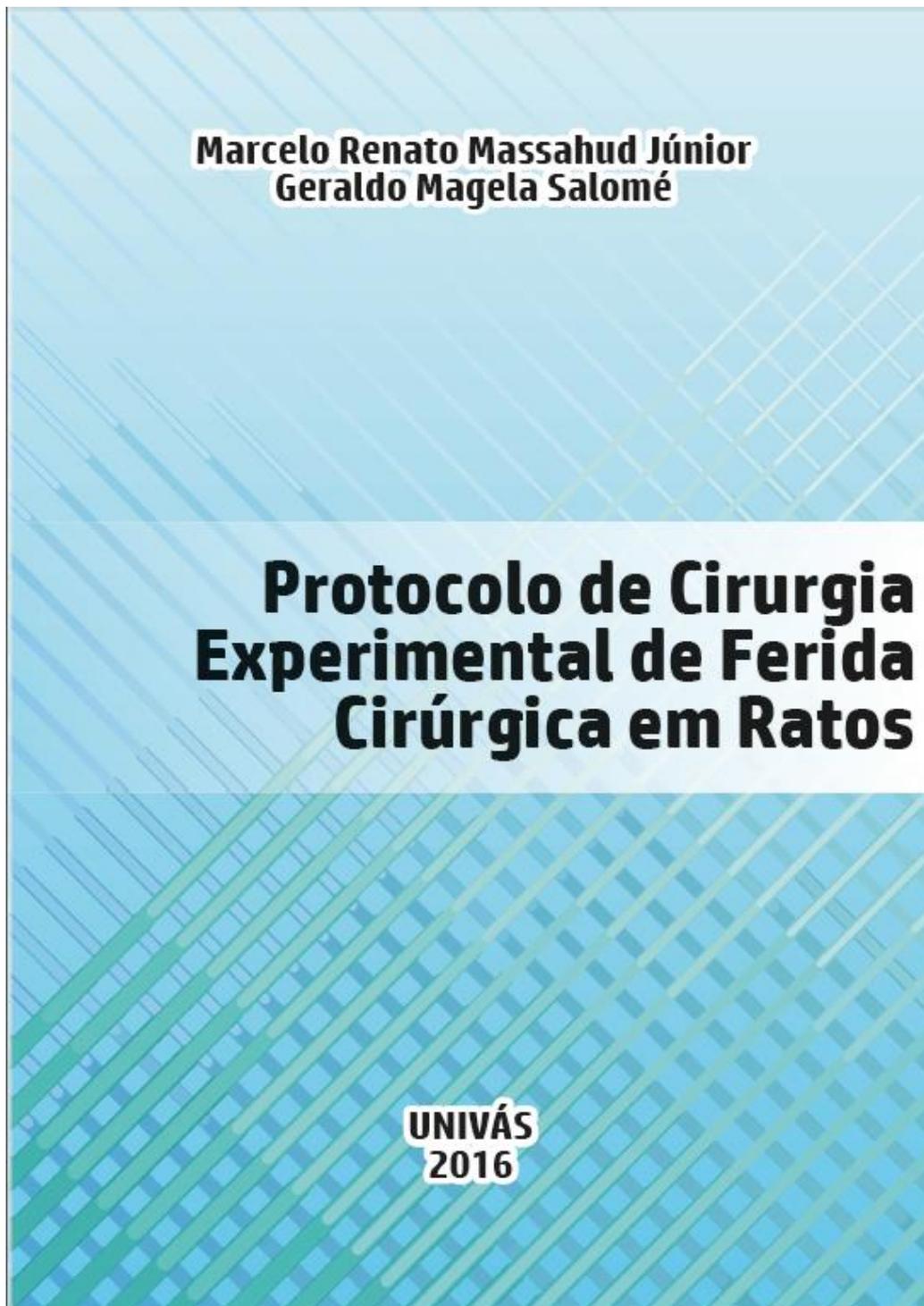
Tabela 8: Média, Mediana e Desvio Padrão das áreas das feridas nos grupos Laser+Microcorrente e Controle.

Dias	Grupos						Valor do P
	Laser + Micro			Controle			
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
3	2,040	1,977	0,542	2,036	2,057	0,399	0,9774
6	1,716	1,666	0,497	1,390	1,424	0,360	0,0887
9	0,712	0,615	0,206	0,573	0,576	0,141	0,1276
12	0,282	0,248	0,097	0,302	0,278	0,159	0,9323
15	0,121	0,118	0,027	0,157	0,129	0,087	0,4775
18	0,054	0,057	0,014	0,076	0,078	0,023	0,0284
21	0,008	0,008	0,004	0,019	0,019	0,004	< 0,0001

Mann Whitney significância estatística $p \leq 0,05$

5- PRODUTO

A realização desta pesquisa gerou ao final dois produtos, um protocolo para utilização de laser e microcorrente em feridas cutâneas e um Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em ratos.



Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS)
Mestrado Profissional em Ciências
Aplicadas à Saúde

Protocolo de Cirurgia Experimental em Ferida Cirúrgica em Ratos

Massahud Junior, Marcelo Renato (Coord.).

Cirurgia experimental em ferida cirúrgica em ratos: protocolo / coordenação de Marcelo Renato Massahud Júnior e Geraldo Magela Salomé; colaboração de Margarida Maria de Carvalho Resende, Diego Guimarães Openheimer e Wellington Delfino. – Pouso Alegre: UNIVÁS, 2016.
27f. : il.

ISBN: 978-85-67647-17-3

1. Ratos Wistar. 2. Procedimentos. 3. Cirurgia experimental. I. Salomé, Geraldo Magela (Coord.). II. Rezende, Margarida Maria de Carvalho (Colab.). II. Openheimer, Diego Guimarães (Colab.). III. Delfino, Wellington (Colab.). IV. Título

Marcelo Renato Massahud Júnior
(Coord.)
Geraldo Magela Salomé
(Coord.)

Pouso Alegre, MG
2016

Criação e Informação

Marcelo Renato Massahud Júnior – Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVÁS) - Pouso Alegre, MG

Equipe de Elaboração

Marcelo Renato Massahud Júnior (discente)
Prof. Dr. Geraldo Magela Salomé (orientador)
Margarida Maria de Carvalho Resende (colaboradora)
Diego Guimarães Openheimer (colaborador)
Wellington Delfino (colaborador)

Projeto Gráfico e Diagramação

Cintia Ferreira

Revisão

Antônia Cileide Pereira

Impressão

Gráfica Amaral Editora

Tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte, que não seja para qualquer fim comercial e que haja autorização prévia, por escrito, do autor. Distribuição gratuita.

Sumário

Prefácio	06
1. Apresentação	08
2. Introdução	10
3. Importância do Condicionamento dos Animais	13
4. Quando e Por Que utilizar Animais em Pesquisas	16
5. Procedimentos Gerais para Cirurgias Experimentais	16
5.1. Acomodações dos Ratos	16
5.2. Condicionamento dos Ratos	17
6. Técnica Anestésica	19
6.1. Epilação dos Ratos	19
6.2. Demarcação com Punch	19
6.3. Confeção da Ferida Cirúrgica	20
7. Técnica de Curativo em Ratos	22
7.1. Higienização	22
7.2. Aplicação da Cobertura na Ferida	23
7.2.1. Cobertura com Filme	23
8. Eutanásia dos Animais	24
9. Descarte dos Animais	26
10. Bibliografia	27

Prefácio

A construção de protocolos validados cientificamente, respeitando os fatores técnicos de biossegurança e os princípios da bioética, é requisito fundamental para o desenvolvimento do conhecimento científico.

Neste trabalho os autores se preocuparam, ao longo da dissertação, com temas relevantes e essenciais para a construção e validação da proposta de um Protocolo de Cirurgia Experimental em Ferida Cirúrgica em Ratos, são eles: Importância do Condicionamento dos Animais; Argumentação a respeito de Quando e Por Que utilizar Animais em Pesquisas; Descrição dos Procedimentos Gerais para Cirurgias Experimentais; Técnica Anestésica e de Curativo; Cobertura da Ferida; Eutanásia; e Descarte dos Animais.

A existência de protocolos confiáveis cientificamente possibilitará que, em um futuro próximo, tenhamos propostas de intervenção mais eficazes e mais eficientes no tratamento das feridas cirúrgicas.

Trata-se de tema de alta relevância e de importância transversal para os profissionais da área da Saúde. O convite é para que possamos realizar a leitura deste trabalho com o intuito de provocar acadêmicos, profissionais e pesquisadores da área a darem continuidade a este estudo, de forma comparativa ou não.

A conclusão deste trabalho científico é motivo de orgulho, de respeito aos princípios éticos com animais, e de avanço

do conhecimento científico na respectiva área de estudo.

Boa leitura!

Roberto Mattar Cepeda

*Presidente do Conselho Federal de
Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO)*

1. Apresentação

A ferida em seu conceito é uma solução de continuidade da pele podendo ser aberta ou fechada e que normalmente tem sua origem traumática, há diversas classificações, quanto a sua origem. A área de pesquisa experimental com feridas vem crescendo dia a dia e nesta evolução um protocolo de procedimentos em feridas favorece em muito o campo para pesquisador onde favorece um delineamento ao experimento com animais. O desenvolvimento do protocolo deverá contemplar a necessidade do bem estar animal e a diminuição na utilização de números de animais em pesquisas permanecendo em consonância com a Ética, com os conceitos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal. A utilização de animais para pesquisa em feridas tende a sofrer um declínio ao longo do tempo, desenvolvimentos de novos produtos e ou métodos alternativos esta em ascensão tecnológica e moralmente correta, com a realização de um protocolo este poderá contribuir para esta ascensão visto que novas técnicas de procedimentos para a retração da ferida ou produtos cujo sua ação promova a cicatrização em tempo menor ainda há de se utilizar espécie animal. Uma padronização nos procedimentos não significará uma estagnação em evolução nos estudos, isto porque surgirão técnicas melhores com o aprendizado adquirido pela utilização de um protocolo. A importância da diretriz fornecida por um protocolo nos pro-

cedimentos de feridas favorecerá e beneficiará o bem estar animal abreviando, contudo o sofrimento, uma intervenção rápida, segura, com conceito voltado ao bem da coletividade como um todo no aspecto animal como no humano gera ao protocolo uma ferramenta indispensável ao pesquisador.

A evolução da humanidade esta na capacidade do ser transformar o conhecimento em sabedoria, chegando a isto, através de um processo que teve origem a um protocolo certamente.

Wellington Delfino
Médico Veterinário

2. Introdução

Segundo o Dicionário Aurélio a palavra protocolo possui vários significados: "Ata, nota ou registro dos documentos governamentais, dos atos oficiais, da correspondência de um governo ou tribunal, de uma empresa, universidade etc. *Subdivisão de uma repartição pública (ou empresa privada) em que se registram e/ou se recebem os requerimentos, documentos ou processos. Recibo que registra o número e a data em que um processo ou requerimento foi catalogado e registrado. Acordo regulamentado entre países ou empresas: protocolo internacional. Figurado. Normas e procedimentos que se deve respeitar em cerimônias públicas; formalidade. Figurado. Reunião das regras que regulam os atos públicos; cerimonial. Antigo. Selo utilizado pelos romanos para registrar atos públicos. (Etm. do francês: protocole/ pelo latim: protocollum)" (FERREIRA, 1999).*

Para o presente projeto o protocolo pode ser definido como regras a serem seguidas para a prática da cirurgia experimental em Ratos para confecção de feridas cutâneas.

As pesquisas experimentais são importantes na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas. Sua maior importância está relacionada ao respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em anima nobile. Nesse sentido, o modelo experimental deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar. (FERREIRA,

HOCHMAN, BARBOSA,2005) Enfim a pesquisa experimental tem grande importância para o desenvolvimento de pesquisas para a ciência, sendo uma ferramenta fundamental para a descoberta de novos métodos e técnicas, sem expor em risco, ou minimizando os riscos aos seres humanos.

Apesar da crescente preocupação ética sobre a utilização de animais em pesquisa se faz necessário a padronização dos métodos e técnicas utilizados. E ainda que muito utilizadas existem poucos protocolos validados para as diversas técnicas de cirurgia experimental, se fazendo necessário a padronização das técnicas conhecidas para que os resultados das intervenções possam ser confrontados com menor viés e maior confiabilidade.

Vários pesquisadores relatam que ao realizamos um protocolo de pesquisa experimental é necessário que o profissional tenha compreensão das principais classificações dos modelos experimentais em pesquisa é fundamental para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, assim como para o desenvolvimento de outros. E que esses animais reúnam condições ideais, e que sejam mantidos em ambiente controlado para que atendam os parâmetros de qualidade sanitária e genética, uma vez que são "reagentes biológicos", e os resultados dos experimentos podem ser afetados em razão das condições de cada espécie utilizada. Ainda, quanto maior a uniformidade dos animais em relação às variáveis ambientais, genéticas e experimentais, menor será a quantidade amostral mínima de animais necessários para a pesquisa ser realizada. Assim, os animais utilizados em experimentação podem ser classificados quanto ao *status* ou condição sanitária, genotípica e como modelo experimental. (SCHANAIDER, 2004, SILVA; FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA,2005; SCHANAIDER, 2008; (JR EDVALDO, HO, ALVES, ROCHA, 2012)

Devendo sempre ser observado os principais parâmetros exigidos pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem estar animal, higiene e biossegurança, acomodações e transporte, aclimatação, dieta e hidratação, bem como a técnica propriamente dita, iniciando pela preparação, anestesia, materiais e instrumentos utilizados e cuidados pós operatórios.

O manual de protocolo de cirurgia experimental representa um método eficiente e estruturado, enfim o método deve ser descrito passo a passo, claro e uniformizado. Possui uma estrutura simples capaz de levar a uma rápida e eficiente tomada de decisão pelo profissional na escolha do tipo de pesquisa, tipo de animal que será utilizado.

3. Importância do condicionamento dos animais

Margarida Maria de Carvalho Resende

O rato como qualquer outro animal precisa de ser tratado com respeito. De acordo com código de Ética animal da Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL) é primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona (SBCALL, 2015).

Ainda, em relação à ética deve-se ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência (SBCAL).

Ratos de laboratório geralmente são curiosos, dóceis, se manipulados com frequências e gentilmente, tornam-se domesticados e treinados; são capazes de distinguir objetos que já viram antes, e tem também, a capacidade de sentir medo, dor, desconforto (ANDERSEN *et al*, 2004).

Para que o experimento seja realizado seguindo esses princípios, o rato como animal irracional precisa ser condicionado ao procedimento a ser realizado com finalidade de evitar estresse, seja fácil de manusear e evitar procedimentos bruscos.

Passos para o condicionamento

- Selecionar os ratos de acordo com os critérios do experimento.
- Segregar em gaiola individual, no mínimo 10 dias antes do experimento em prateleiras e em salas específicas para

essa segregação.

- Salas devem seguir normas de controle de ciclo claro e escuro de 12 horas, controle de temperatura, umidade e de ruídos e mantê-los com oferta de alimentação e hidratação à vontade.

- Mantê-lo nessa sala sem retirá-lo da gaiola, por 1 dia, para acostumar.

- No segundo e terceiro dia o pesquisador deverá pegar a gaiola com delicadeza, sem fazer ruídos em atritos com mesas ou bancadas, com movimentos suaves colocá-la na sala de experimento.

Ficar perto da gaiola para que o rato sinta a presença do pesquisador, sinta o cheiro e perceba a voz, que deve ser em tom suave com direção de palavras rotineiras ao mesmo.

- No quarto e quinto dia repetir a mesma operação, e pegar o rato com luvas de couro, colocá-lo na bancada ou mesa do experimento e deixá-lo percorrer nesse novo território, explorando-o.

- Do sexto ao décimo dia pegar o rato com luvas de procedimento. A forma de pegar o rato é segurando-o pela pele do dorso, fazendo uma prega e estirando-a de forma a imobilizá-lo até que acostume. Soltar o rato na bancada ou mesa, cercado-o para que não possa escapar do local e deixá-lo sondar esse território. Deixá-lo se esconder em por debaixo do braço dobrado do pesquisador.

- Ao volta-lo para a gaiola manter movimentos suaves, sem jogar ou arrastar.

- Simular o procedimento do experimento para que se acostume.

- Ao final de 10 dias espera-se que o rato esteja condicionado, caso ainda esteja arisco, repetir procedimentos por mais dias.

Observa-se que o rato já esteja condicionado, pela sua docilidade e tranquilidade. Em caso contrário, quando observa-se agressividade, como tentar fugir, morder, urinar e defecar com frequência e aumento da frequência respiratória e cardíaca indicam sinais indicativos de falta de condicionamento. Deve-se evitar no ambiente de condicionamento e manter no de experimento, falar alto, fazer excesso de ruídos, apertar, pegar no rato abruptamente, jogar o rato na gaiola.



Figuras de ratos em gaiola individual e em manuseio para condicionar manejos.

4. Quando e por que utilizar animais em pesquisas

A utilização de modelos animais em pesquisa não é algo novo, desde que Claude Bernard lançou seu trabalho "Introdução ao Estudo da medicina Experimental" no ano de 1865, no qual esse procurou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina.

Mesmo com muitos debates e controversa, os modelos animais são largamente utilizados em pesquisas.

As justificativas para utilização do modelo animal são diversas como por exemplo não expor o ser humano ao risco, resguardando sua integridade física e emocional, dificuldades para se conseguir um número suficiente de indivíduos para a realização da pesquisa, conseguir um grupo homogêneo desses indivíduos para a realização de pesquisas, dificuldades de acompanhamento dos indivíduos durante o período da intervenção, agressividade da intervenção, abandono da pesquisa, coleta de material a ser pesquisado/analísado etc, esses são apenas algumas das dificuldades e limitações encontradas por pesquisadores que inviabilizam a pesquisa com seres humanos e justificam a utilização de modelos animais em pesquisas.

5. Procedimentos gerais para todas as pesquisas experimentais

5-1. Acomodações dos Ratos

Gaiolas de polipropileno com água e comida ad libitum, com no máximo 3 animais por gaiola.

É importante que o animal passe por um período de adaptação de no mínimo 10 dias, alocado individualmente na gaiola. Nesse período o animal deverá ser condicionado ao contato com o pesquisador e a permanecer no posicionamento a ser executado durante o processo.



Figura 2 - Sistema de alojamento das ratas, com numeração dos camundongos.

5-2. Condicionamento dos Ratos

Manejo dos animais dos Ratos

Retire o animal da caixa, suspendendo-o pela cauda e o coloque sobre a mesa ou bancada, sem soltá-lo;

Não deixe o animal suspenso no ar pois ele pode fazer movimentos bruscos que podem ocasionar o seccionamento da

cauda;

Mantenha o animal sobre a mesa segurando com cuidado na posição que esse foi condicionado.

Execute o procedimento desejado (injeção, coleta de fluidos) e libere o animal em seguida, devolvendo-o para a caixa.

6. Técnica anestésica nos Ratos

As ratas foram submetidas à anestesia por via intramuscular, com associação do anestésico Cloridrato de Quetamina (1mg/100g de peso) e do Cloridrato de Xilazina (2mg/100g de peso), para a produção de uma ferida circular em seu dorso (Figura 4). No pós-operatório imediato foram diluídas quatro gotas de Tylenol em 200ml de água.



Figura 3 - Anestesia das ratas.

18

6-1. Epilação dos pêlos

Com as ratas anestesiadas, deu-se início à epilação manual dos pelos. Primeiramente demarcou-se a região dorsal das ratas com pincel atômico, sendo quatro centímetros na largura e cinco centímetros no comprimento (figura 4) e os pelos foram retirados manualmente contra o sentido deles (Figura 4 e 5).



Figura 4 - Epilação manual dos pelos, fase inicial.



Figura 5 - Epilação manual dos pelos, fase final.

6-2. Demarcação com Punch

Para a demarcação da ferida foi utilizado um punch de aço inoxidável de 2,13cm de diâmetro, com um corte circular superficial (Figura 6). O punch foi pressionado contra a ferida e realizado um movimento circular, ora em sentido horário, ora em sentido anti-horário, realizando assim a demarcação da ferida (Figuras 7 e 8).

19



Figura 6 -
Punch de aço
inoxidável.



Figura 7 -
Aplicação do
Punch Metálico.



Figura 8 -
Área
demarcada.

6-3. Confeção da ferida cirúrgica

Após a demarcação da ferida com o punch, iniciou-se a remoção do tecido utilizando um bisturi com lâmina número 15 para a incisão e a ressecção da pele e do panículo carnoso até a fáscia muscular superficial, produzindo a ferida (Figuras 9, 10 e 11).

A remoção dos tecidos durava em torno de três a cinco mi-

nutos por animal, sendo que o mesmo estava anestesiado até o fim do processo cirúrgico.

Após o ato cirúrgico, os animais foram encaminhados para avaliação e tratamento de acordo com o seu grupo e, posteriormente, alocados em uma mesa com O₂ ligado a quatro litros por minuto.

Ao término do efeito do anestésico as ratas foram encaminhadas para as respectivas gaiolas.



Figura 9 -
Confeção da ferida I.

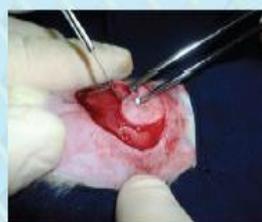


Figura 10 -
Confeção da ferida II.



Figura 11 -
Ferida confeccionada.

7. Técnica de curativo em Ratos

A realização do curativo é procedimento que não deve ser desprezado pois o mesmo evita a infecção da ferida além de ser um momento em que o pesquisador acompanha a evolução do processo de cicatrização.

7.1- Higienização:

Para a higienização deve ser aquecido a 35°C 20 ml de soro fisiológico, despejado diretamente na superfície da ferida em um jato contínuo por meio de uma seringa de 20 ml (Figura 12).

Após a aplicação da solução fisiológica, a limpeza se deu por meio da utilização de uma gaze estéril, para secar a ferida (Figura 13).

Durante a limpeza, e sempre que necessário, foi realizado o desbridamento da crosta, com solução fisiológica e gaze estéril, sempre na fase inicial do processo da crosta.



Figura 12 - Solução fisiológica preaquecida.



Figura 13 - Limpeza com gaze não estéril.

7.2- Aplicação da cobertura na ferida

A cobertura da ferida é um processo importante a ser observado pelo pesquisador, tendo como objetivos: Proteção mecânica da área afetada; Reforço estrutural da superfície local; Contenção ou minimização de hemorragias; Absorção de exsudatos ou secreções oriundas do tecido afetado; Impedimento, minimização ou prevenção de infecções recorrentes.

7.2.1- Cobertura com Filme

O filme transparente é adesivo e estéril, complementado por suporte quadriculado para a mensuração da ferida. O filme é impermeável à água e bactérias e permeável aos vapores úmidos, permitindo que o excesso de exsudato evapore, minimizando a maceração da pele (Figuras 14, 15 e 16).

O filme transparente é de dupla face e sua aplicação e remoção não causam dor ao animal, bem como não limitam o seu movimento, sendo indicado no tratamento de feridas superficiais, cortes, abrasões, pequenas queimaduras e áreas doadoras de enxerto.



Figura 14 - Cobertura com filme transparente.



Figura 15 - Filme transparente dupla face.



Figura 16 - Filme transparente dupla face sobre a ferida.

8. Eutanásia dos animais

Para a realização da Eutanásia serão seguidas as recomendações da RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA.

Para minimizar a dor e o desconforto devem ser utilizadas

drogas anestésicas, analgésicas, tranquilizantes e ainda a eutanásia.

A profundidade anestésica deve ser avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia).

Técnicas anestésicas sugeridas: Xilazina 5 a 10 mg/Kg + 50 a 75 mg/Kg Quetamina misturadas na mesma seringa.

Por definição, eutanásia é uma forma de abreviar-se a vida de um ser vivo, sem dor ou sofrimento. Os critérios primários para a eutanásia em termos de bem-estar animal são: Utilização de métodos sem dor; Os animais devem atingir rápido estado de inconsciência e morte; Requerer um mínimo de contenção, e evitar a excitabilidade do animal; Adequado para a idade e estado de saúde do animal em questão; Causar um mínimo de sofrimento e estresse; Simples de administrar (em pequenas doses, se possível); Seguro para o operador e tanto quanto possível, esteticamente aceitável para este; Deve ser realizada distante de outros animais.

Pentobarbital sódico: Injetado via intravenosa ou intraperitoneal age rapidamente e é uma forma aceitável de eutanásia. As pessoas envolvidas devem ser treinadas no método de injeção. Esta droga pode causar irritação do peritônio, o que pode ser evitado pela diluição. Para a realização da eutanásia é recomendada a utilização de três vezes a dose anestésica. Para a eutanásia de ratos e hamsters o pentobarbital pode ser administrado por via intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg e 23 80-150 mg/Kg, respectivamente, enquanto que para coelhos é utilizado na dose de 200 mg/Kg, por via intravenosa.

9. Descarte dos animais

Em biossegurança, o descarte de carcaças é um ato que requer grande senso de responsabilidade por parte do profissional que o está executando. Isso porque toda e qualquer carcaça, esteja ela contaminada por agentes patogênicos ou não, é considerada resíduo sólido, classificado como Grupo A, de acordo com a legislação em vigor em nosso país, expressa através da Resolução no 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (aurtoe).

Mais especificamente, as carcaças de animais, mortos por morte natural ou sacrificados, devem ser destruídas o mais rápido possível, após a devida necropsia e colheita de material indicada, evitando-se assim o risco de contaminação do ambiente, por meio dos fluidos e das secreções excretados pelos cadáveres, que se transformam em excelentes meios de cultura. O armazenamento de carcaças requer cuidados especiais. É essencial o uso de sacos plásticos, com capacidade e resistência compatíveis com o peso das carcaças, devidamente identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente (autor).

Depois de acondicionadas em sacos plásticos, as carcaças devem ser mantidas em câmaras frias, por no máximo 24 horas, ou em freezers a -18 °C, caso não sejam levadas ao seu destino final. A proteção pessoal do profissional que manuseia carcaças de animais é fundamental. Uniformes adequados, com luvas e máscara, são recomendáveis. A consciência de que existe risco potencial de contaminação deve estar sempre presente na conduta dos técnicos. O transporte das carcaças deve ser em sacos plásticos ou caixas hermeticamente fechadas, de forma rápida e segura, evitando-se a contaminação do ambiente através de possíveis vazamentos de sangue ou outros excrementos do ca-

dáver do animal. Quanto ao destino das carcaças, este pode ser de três formas: aterro sanitário, autoclavação e incineração.

10- Bibliografia

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins JCF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Gráfica Ave Maria. São Paulo. 2004.

BERNARD C, An Introduction to the study of experimental medicine (1865). In: Images from the history of medicine division. National Library of Medicine. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov>

Schanaider A, SILVA PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir. Bras. 2004; 19(4):441-447.

Schnaider TB. Ética e pesquisa. Acta Cir. Bras. 2008; 23(1): 107-111.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir. Bras. 2005; 20(2): 28-34.

FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. Aurélio século XXI. 3.ed. RIO DE JANEIRO: Nova Fronteira, 1999. 2128p

Jr Edvaldo LR, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. Acta Cir. Bras. 2012; 27(9):659-663.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013, Disponível em http://www.mct.gov.br/upd_blob/0228/228451.pdf.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Resíduos Sólidos; Nbr 10004. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução no 5. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, 1993.

MONREAL, J. & ZEPEDA, F. Consideraciones sobre el Manejo de Residuos de Hospitales en America Latina. Washington, D.C.: Opas, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urban Solid Waste Management. Copenhagen: WHO, 1991-1993.

SBCALL. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65. Acesso em: 20 ago 2015.

6- APLICABILIDADE

A utilização da laserterapia de baixa potência no tratamento de ferida, como tecnologia terapêutica tem apresentado um crescimento significativo. As propriedades curativas da radiação a *laser*, aliadas à segurança do tratamento, parecem ser os principais responsáveis por esse crescimento, o que justifica o aumento do interesse dos pesquisadores da área biomédica para investigar os mecanismos de ação e os efeitos terapêuticos dos *lasers* de baixa potência. (COGO *et al.*, 2002; SILVEIRA, *et al.*, 2009)

A laserterapia têm efeito sobre o processo da epitelização de lesão, através da redução do tempo de cicatrização. Essa resposta torna possível um retorno mais rápido do indivíduo às suas atividades de rotina. Entretanto, alguns mecanismos envolvidos nessa resposta ainda permanecem obscuros, principalmente no que se refere aos efeitos do laser sobre a cadeia respiratória mitocondrial e sobre os biomarcadores de estresse oxidativo. (SAY *et al.*, 2003; KIM, PAL, LEE, 2000)

Vários estudos tem mostrado que o uso do *laser* de baixa potência no tratamento de ferida efeito anti-inflamatório, promove redução da dor e aceleração da proliferação celular, em resumo, melhora no processo de cicatrização - depende do comprimento de onda, dose e condição local. O *laser* de baixa potência tem a capacidade de penetrar nos tecidos, atuando na síntese do colágeno, no estímulo da circulação local e aumentando a atividade mitótica das células epiteliais. (CARNEIRO *et al.*, 2010; LINS *et al.*, 2010;; GONCALVES *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2013)

O presente estudo, ao comparar os efeitos do laser de baixa intensidade e microcorrente demonstrou eficácia no tratamento das feridas cutâneas produzidas em ratos, porém, houve diferença entre os grupos, sendo que o grupo que recebeu o tratamento de laserterapia, demonstrou melhores resultados; seguido pelo grupo laserterapia associado à microcorrente e grupo tratado por microcorrente, todos obtiveram resultados melhores que o grupo controle.

Estudos demostram que o laser é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais. Essa terapia possui efeitos sobre o colágeno e a síntese de colágeno (BUSNARDO, SIMOES, 2010).

Autores investigaram os efeitos de diferentes tipos de Laserterapia de Baixa Intensidade em retalhos cutâneos de ratos, a aplicação do Laser de Baixa Intensidade apresentou resultado significativo na cicatrização destas feridas (BALDAN, PASQUAL, CASAROTTO, 2010).

ABREU *et al.*, (2011) investigaram a cicatrização de tecido epitelial tratado com Laserterapia de Baixa Intensidade durante 21 dias com avaliação no 7^o, 14^o e 21^o dias em ratos e

demonstraram que na avaliação do 7^o dia houve pouca diferença em relação ao grupo controle. Já na avaliação do 14^o e 21^o dias a diferença foi mais significativa, evidenciando a eficácia do grupo tratado com Laser de Baixa Intensidade (ABREU & FAGUNDES, 2011).

No presente estudo utilizou-se o Laser de Baixa Intensidade 904nm a 4 J/cm², identificou-se resultados significantes quando comparados aos demais grupos. Verificou-se diferença significativa a partir do 9^o dia até o 21^o dia (LEAL, BEZERRA, LEMOS, 2013).

E estudo que investigou o efeito da Laserterapia de Baixa Intensidade em feridas circulares em ratos definiu-se que a Laserterapia de Baixa Intensidade é um tratamento de fácil aplicação, seguro e rentável para feridas superficiais (ADAMSKAYA *et al.*, 2011).

Para avaliar o efeito do Laser de Baixa Intensidade a 904nm na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos foi realizado estudo, concluindo que a Laserterapia de Baixa Intensidade reduziu a intensidade da reação inflamatória e influenciou a dinâmica da resposta imune, induzindo mudança no padrão de infiltração de leucócitos (SANATI *et al.*, 2011).

PASSARINI JUNIOR *et al.*, (2012) comparando o uso de microcorrente de forma isolada e associada ao óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) em ratos, observou através de análise histológica que os grupos tratados com microcorrente (10µa/2 minutos) e óleo de pinhão obtiveram melhor resultado que o grupo controle e grupo que recebeu apenas óleo de pinhão manso. (PASSARINI JUNIOR *et al.*, 2012).

Em outro estudo, a microcorrente foi utilizada de forma isolada e combinada ao gel de *Aloe Vera* nas feridas produzidas em ratos e os grupos tratados com microcorrentes, de forma isolada ou associada à *Aloe Vera* apresentaram início precoce da fase proliferativa (MENDONÇA *et al.*, 2009)

Estudos utilizando microcorrentes na cicatrização tecidual de queimaduras de terceiro grau em ratos mostrou cicatrização mais rápida, ordenada e melhor resposta inflamatória em comparação ao grupo controle (STEFFANI *et al.*, 2011).

Estudo utilizando laser e microcorrente na cicatrização de feridas térmicas em ratos, de forma isolada e associada, mostrou resultados positivos e semelhantes nas terapias quando utilizadas de forma isolada, mas não obtiveram os mesmos resultados quando associados (FREITAS *et al.*, 2013).

KORELO *et al.*, (2012) concluíram que microcorrente é eficaz no controle da dor em pacientes com úlceras venosas.

Estudo utilizando microcorrente com intensidade de 3 μ A, por 11,5 minutos em uma polaridade e 11,5 minutos numa polaridade oposta em feridas crônicas resistentes, acelerou a cicatrização (LEE *et al.*, 2007). Outro estudo comparou as taxas de cura e fluxo sanguíneo da pele de estágio crônico III e IV ferimentos em pessoas com diabetes e sem diabetes, utilizando uma sala quente e estimulação elétrica (microcorrente), o tratamento consistiu em estimulação elétrica bifásica a 20 μ A durante 30 minutos, 3 vezes por semana durante 4 semanas, numa sala de 32 graus C. O fluxo sanguíneo da pele foi medido por impressora a *laser Doppler*, resultando num aumento significativo do fluxo sanguíneo nessas feridas (LAWSON & PETROFSKY.2007)

Estudo utilizando Laser na cicatrização de feridas cutâneas mostrou resultado positivo se comparado ao grupo controle. (OLIVEIRA *et al.*, 2010). BUSNARDO & SIMOES (2010), demonstraram a capacidade do laser de baixa intensidade em influenciar a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais, possuindo portanto, efeitos sobre a produção do colágeno. Outros pesquisadores encontraram efeitos positivos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos utilizando diferentes tipos de laser de baixa potência. (BALDAN, PASQUAL, CASAROTTO, 2010).

Estudo comparativo de dois tipos de LLLT na cicatrização de feridas, utilizou o laser de AsGa e o Laser HeNe (Hélio-Neônio). A AsGa obteve melhor resultado. (SANATI *et al.*, 2011).

A Laserterapia de Baixa Intensidade também estimulou a deposição e melhorou a organização das fibras de colágeno. Foi utilizado o Laser 904nm que se mostrou eficaz no tratamento das feridas cirúrgicas em ratos (MELO *et al.*, 2011). Enfim apesar do *laser* e da microcorrente separadamente serem benéficos para a cicatrização de tecidos, sua combinação parece diminuir a ação terapêutica. Os resultados recomendam atenção durante o tratamento da ferida, e a sugestão da terapêutica com essas modalidades de modo independente pode ser o melhor curso de ação. Os mecanismos de ação celular e biofísico que envolvem o uso combinado de recursos terapêuticos merecem maior investigação para se obter explicação mais completa dos fenômenos analisados.

Apesar da crescente preocupação com a utilização do modelo animal em pesquisas a utilização dos mesmos são de extrema importância para a descoberta e aperfeiçoamento de novas drogas e tecnologias para a saúde e bem estar humano. A criação do protocolo visa a otimização da utilização desse modelo, reduzindo ao máximo o número de indivíduos, minimizando as perdas, e zelando pelo bem estar dos animais e princípios da bioética, auxiliando o pesquisador a atingir suas expectativas.

7- CONCLUSÃO

O grupo laserterapia AsGa 904Nm a 4 J/cm² foi o mais eficaz na regressão de feridas cutâneas em ratas. E através desse estudo foi possível construir o “Protocolo de Cirurgia Experimental de Ferida Cirúrgica em Ratos”

8- IMPACTO SOCIAL

As feridas representam problema de saúde pública de grande impacto econômico e social.

O desenvolvimento e aprimoramento de métodos e técnicas que possam acelerar o período de cicatrização e minimizar os riscos de infecções, são fundamentais para a recuperação dos pacientes acometidos de feridas cutâneas e propiciam impactos positivos na qualidade de vida, desde redução de custos até evitando o isolamento social.

O advento da tecnologia determinou desenvolvimento de novos aparelhos melhorados e com isso, novos estudos estão sendo propostos para os mais diversos fins, dentre eles a aceleração da cicatrização de feridas.

O trabalho proposto comprovou a eficácia da laserterapia de baixa intensidade e da microcorrente no processo de cicatrização de feridas cutâneas, sendo portanto, de grande importância, haja visto que são equipamentos de baixo custo, fácil manuseio e baixa manutenção, além de necessitar de poucos insumos para sua utilização como gel de carbopol e papel toalha. Podendo ser adquirido pelas mais diferentes unidades de saúde e beneficiando um grande número de pacientes.

O Protocolo de Cirurgia Experimental de Feridas Cirúrgicas em ratos irá beneficiar diversos pesquisadores que anseiam por testar novas drogas e tecnologias no processo de cicatrização de feridas cutâneas e utilizam o modelo animal para desenvolver seus estudos.

9- REFERÊNCIA

Abramoff MMF, Pereira MD, Seixas MT, Segreto RA, Guilherme A, Ferreira LM . Low-level laser therapy on bone repair of rat tibiae exposed to ionizing radiation. *Photomedicine and Laser Surgery* (Online). 2014; 32:1-9.

Abreu JAC, Sousa AL, Alves CLGF, Nunes JT. Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser. *Scientia Medica*. 2011; 21 (3): 96-100.

Abreu MF, Fagundes DS. Ação da irradiação laser de baixa frequência (LLLT) sobre os mecanismos celulares envolvidos na reparação de tecido nervoso periférico. *Rev Cie Fac Edu Mei Amb* 2011; 2(2):80-96.

Adamskaya N, Dungal P, Mittermayr R, Hartinger J, Feichtinger G, Wassermann K, Redl H, van Griensven M. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury* 2011; 42(9):917-21.

Agne, JE. Eletroterapia: teoria e prática. 1ª ed. Santa Maria: Orium, 2005.

Almeida AS, Moreira CNO, Salomé GM. Pressure Ulcer Scale for Healing no acompanhamento da cicatrização em pacientes idosos com úlcera de perna. *Bras. Cir. Plást.* 2014;29(1):120-27.

Aquino RLS. Laser de baixa potência no tratamento das disfunções têm poro mandibulares: um ensaio clínico randomizado. 2005. Dissertação de Mestre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Baldan C, Pasqual AM, Casarotto RA. Dose-dependência do laser de baixa intensidade (670nm) na viabilidade de retalhos cutâneos randômicos em ratos. *J Health Sci Inst* 2010; 28(4): 359-62.

Borges FS. Modalidades Terapêuticas nas Disfunções Estéticas. São Paulo: Editora Phorte, 2006.

Busnardo VL, Simões MLPB. Effects of low- level helium-neon laser on induced wound healing in rats. *Rev Bras Fisioter.* 2010; 14(1) 45-51.

Carneiro MIS *et al.* Estudo comparativo do uso de extrato de *Pfaffia glomerata* e do laser de baixa potência (Hélio-Neônio) na cicatrização de feridas em ratos. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.* [online]. 2010;23,(3): 163-67.

Carvalho DV, Gomes FSL, Carmo DJAC, Batista JA, Viana MN. Planimetria como método para mensuração de feridas. *REME– Rev. Min. Enf.* 2006; 10(4):425-28.

Cogo JC, Ribeiro W, Lopes-Martins RAB, Aimbire FSC. Avaliação do efeito de dois lasers de baixa potência AsGa e HeNe na dermatite tópica induzida por óleo de cróton em orelha de camundongos. *Rev Bras Fisioter.* 2002;3(4):207-15.

Declair V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com acido linoléico. *J Bras Med.*2002; 82(6): 3-7.

Ferreira LM, Hochman B.; Barbosa MVJ. Modelos Experimentais em Pesquisa, *Acta Cir. Bras.* 2005;20 (suppl.2): 28-34.

Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir.*2008;35(3):203-6.

Freitas RPA, Barcelos APM, Nóbrega BM, Macedo AB, Oliveira AR, Ramos AMO, Vieira WHB. Low-level laser therapy and micro current in burn wound healing in rats: associated or isolated therapy? *Fisioter. Pesqui.* vol.20 no.1 São Paulo Mar. 2013.

Gardona RGB, Ferracioli MM, Pereira MTJ, Salomé GM . Avaliação da qualidade dos registros dos curativos em prontuários, realizados pela enfermagem. *Bras. Cir. Plást.* 2014; 28(4): 686-92.

Gonçalves RV et al. Influência do laser arseneto de gálio-alumínio em feridas cutâneas de ratos. *Fisioter. mov. (Impr.)* [online]. 2010; (3) 381-88.

Guirro, E. Fisioterapia Dermato-Funcional. Fundamentos, recursos, patologias. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.

Jr Edvaldo LR, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. *Acta Cir. Bras.* 2012; 27(9):659-63.

Henriques ÁCG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura, *Rev. Col. Bras. Cir.* 2010; 37(4): 295-302.

Kim YG, Pal SC, Lee SR. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne laser. *Lasers Surg Med.* 2000;27(5):420-26.

Korelo RI, Valderramas S, Ternoski B, Medeiros DS, Andres LF, Adolph SMM. Aplicação da microcorrente como recurso para tratamento de úlceras venosas: um estudo piloto. *Rev. Latino-Am Enfermagem.* 2012; 20 (4): 752-60.

Lawson D, Petrofsky JS. A randomized control study on the effect of biphasic electrical stimulation in a warm room on skin blood flow and healing rates in chronic wounds of patients with and without diabetes. *Med Sci Monit.* 2007 Jun;13(6): 258-63.

Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. Effectiveness of HeNe 632.8 nm laser on skin tissue integrity repair in experimental animals: a systematic review. *Fisioter Pesq.* 2012;9(3):290-96.

Lee BY, Wendell K, Al-Waili N, Butler G. Ultra-low microcurrent therapy: a novel approach for treatment of chronic resistant wounds. *Adv Ther.* 2007;24(6):1202-9.

Lins RDAU *et al.* Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An. Bras. Dermatol.* [online]. 2010; 85 (6):849-55.

Melo VA, Anjos DC, Albuquerque Junior R, Melo DB, Carvalho FU. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 2011; 26(2):129-34.

Mendonça FAS, Passarini Junior JR, Esquisatto MAM, Mendonça JS, Franchini CC, Santos GMT. Effects of the application of *Aloe vera* (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009; 24 (2): 150-55.

Oliveira GEC, Lima MMI, Almeida BB, Costa BTMA, Polacow ML. Effect of laser (670nm) on healing of wounds covered with occlusive dressing: a histologic and biomechanical analysis. *Photomed Laser Surg* 2010; 28(5):629-34.

Passarini Junior JR; Gaspi FOG, Neves LMG, Esquisatto MAM, Santos GMT, Mendonça FAS. Application of *Jatropha curcas* L. seed oil (*Euphorbiaceae*) and microcurrent on the healing of experimental wounds in Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2012; 27 (7) 441-7.

Pieri JS. A utilização do laser de baixa potência AlGaInp na cicatrização do pós-operatório da cirurgia de abdominoplastia em pacientes de uma clínica de cirurgia plástica na cidade de Criciúma-sc. Trabalho de Conclusão de Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Santa Catarina, Brasil, novembro de 2009.

Reis, FA *et al.* Efeito da terapia com laser de Arseneto de gálio e alumínio (660Nm) sobre a recuperação do nervo ciático de ratos após lesão por neurotome seguida de anastomose epineural: análise funcional. *Rev. bras. fisioter.* 2008. 12 (3): 215-21.

Robinson AJ. Instrumentação para eletroterapia. In: Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia clínica - eletroterapia e teste eletrofisiológico*. 2ª ed., Porto Alegre, Artmed editora: 2001;43/83.

Salomé GM, Esposito VHC. Vivências de acadêmicos de enfermagem durante o cuidado prestado às pessoas com feridas. *Rev. Bras. Enferm.* 2008; 61(6); 822-27.

Santos PF, Almeida SA, Silveira MM, Salomé GM, Ferreira LM. Use of the Pressure Ulcer Scale for Healing tool to evaluate the healing of chronic leg ulcers. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2013; 28 (1): 133-41.

Sanati MH, Torkaman G, Hedayati M, Dizaji MM. Effect of GaAs (904nm) and HeNe (632.8nm) laser on injury potential of skin full - thickness wound. *Photochem Photobiol B*. 2011; 3(103):180 – 85.

Say KG, Gonçalves RC, Renno ACM, Parizatto NA. O tratamento fisioterapêutico de úlceras cutâneas venosas crônicas através da laserterapia com dois comprimentos de onda. *Fisioter Bras*. 2003;4(1):39-48.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir. Bras*. 2004; 19(4):441-47.

Schnaider TB. Ética e pesquisa. *Acta Cir. Bras*. 2008; 23(1): 107-111.

Silveira, PCL *et al*. Effects of low-level laser therapy on epidermal oxidative response induced by wound healing. *Rev. Bras. Fisioter*. [online]. 2009;13 (4): 281-87.

Starkey C. Recursos Terapêuticos em Fisioterapia. 2.ed. São Paulo: Manole,2001.

Steffani, JA; Kroth, A; Lorencete, NA; D'Agostini, M. Uso de microcorrentes na cicatrização tecidual. *Evidência*. 2011; 11 (1): 43-50.

Tuyama LY, Alves FE, Fragoso MPV, Watanabe HAW. Feridas crônicas de membros inferiores: proposta de sistematização de assistência de enfermagem nível ambulatorial. *Nursing*. 2004; 75(7):46-50.

Wolfenson M ; Hochman B ; Ferreira L M . skin tightening in lipoplasty using a diode laser. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 135(5):1369-77.

FONTES CONSULTADAS

Manual do Sistema para Laserterapia, Flash Laser I, II e III, Manual do Usuário, D.M.C Equipamentos, São Carlos 1-15, 2011.

Manual do Equipamento Laser HTM Compact, Amparo, 1-50, Revisão 07, 2014.

Manual de Instrução de Uso Laserpulse Ibramed, Industria Brasileira de Equipamentos Médicos EIRELI, 1-50, Revisão 12, 2012.

Manual de Normalização de trabalhos Acadêmicos da ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas 2014.

Manual de Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP,2011

Manual de utilização de Animais/Fiocruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2008.

ANEXO 1 PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
PROTOCOLO: 208/14

TÍTULO: ASSOCIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE COM A MICROCORRENTE NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS

PESQUISADOR: MARCELO RENATO MASSAHUD JUNIOR
ORIENTADOR: GERALDO MAGELA SALOMÉ
COLABORADORES: DIEGO GUIMARÃES OPEHNEIMER
GERALDO MAGELA SALOMÉ
PATRÍCIA FERREIRA DO ESPIRITO SANTO
DANIELA EIKO IBA
DENIS SALLES MISSASSE
KEILA PEREIRA JERONIMO
CARLA RAFAELA RAPOUSO DOS REIS
PAULA NAIARA DE LIMA
TAYNE APARECIDA DOS SANTOS

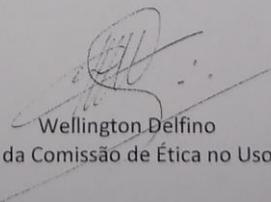
A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Vale do Sapucaí, através de seu Coordenador, após análise do projeto de pesquisa acima mencionado em suas devidas correções resolve:

Aprovar e liberar a pesquisa para seu desenvolvimento

Deverá o seu autor pesquisador solicitar previamente a esta comissão todas as alterações e mudanças no projeto que se faça necessária sob pena da suspensão do desenvolvimento do projeto de pesquisa sem a prerrogativa de ônus a esta comissão, conforme a Resolução Normativa nº 01 de 2010 art. 9º do CONCEA.

Deverá ainda, o pesquisador(a), apresentar a esta Comissão de Ética de Uso Animal o relatório parcial do desenvolvimento da pesquisa em **dezembro de 2014** e o relatório final em **março de 2015**.

Ficará suspensa automaticamente a pesquisa no Sistema CIUCA - Ministério da Ciência Tecnologia e Informação, caso não apresente os devidos relatórios em seu referido prazo.


Wellington Delfino

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Pouso Alegre, 29 de agosto de 2014.

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Universidade do Vale do Sapucaí – CNPJ n.º 23.951.916/0002-03

Unidade Fátima – Av. Prefeito Tuany Toledo, 470 - Fátima I - Tel: (35) 3449-9269/ 9232 - e-mail: posgraduacao@univas.edu.br