

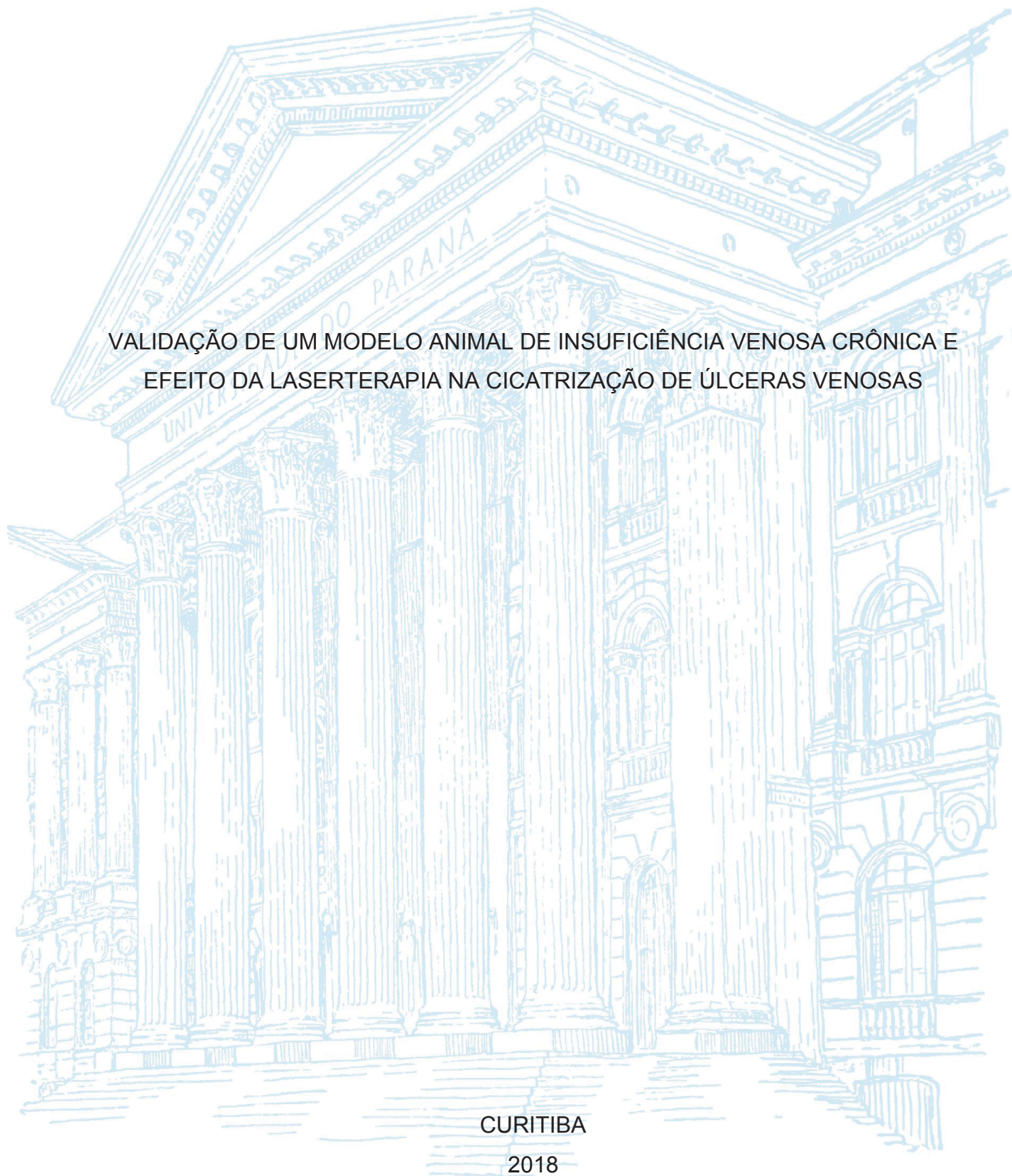
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO NEVES ARAÚJO

VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA E
EFEITO DA LASERTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS VENOSAS

CURITIBA

2018



DIEGO NEVES ARAÚJO

VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA E
EFEITO DA LASERTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS VENOSAS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Fisiologia, no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Araújo, Diego Neves

Validação de um modelo animal de insuficiência venosa crônica e efeito de laserterapia na cicatrização de úlceras venosas. / Diego Neves Araújo.
– Curitiba, 2018.

76 p.: il.

Orientador: Fernando Augusto Lavezzo Dias

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Insuficiência venosa 2. Cicatrização 3. Lasers I. Título II. Dias, Fernando Augusto Lavezzo III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.14



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **DIEGO NEVES ARAÚJO** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 13 de agosto de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
APROVADO	Prof. Dr. Rosalvo T. Hochmuller Fogaça UFPR - Membro Titular	
APROVADO	Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez UFPR - Membro Titular	
APROVADO	Profa. Dra. Ariani C. Szkudlarek UFPR - Membro Titular	
APROVADO	Profa. Dra. Danielle Aparecida Gomes UFMG - Membro Titular	
APROVADO	Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora	

Dedico esse trabalho a três pessoas.

Primeiramente à Sylvia Maria Cortês Bonifácio de Araujo, pelo amor, pelo companheirismo em todos os aspectos da vida e por me proporcionar sentimentos que dão sentido à existência.

E a Severino Pedro e Sebastiana Barbosa, diante do infinito carinho que recebi, principalmente nos meus primeiros anos de vida, e por demonstrar que o amor independe de laços cosanguíneos e situação financeira.

AGRADECIMENTOS

À minha família, base da minha vida, cujos ensinamentos, apesar de distantes de uma vida acadêmica, me transformaram no que sou.

À Sylvia Bonifácio, minha companheira, à qual dedico esse trabalho.

A Fernando Dias, meu orientador. Tive a sorte e a honra de ter toda minha pós-graduação guiada por uma pessoa inteligente, respeitosa, íntegra e humana, que orgulhosamente terei como referência ao longo da minha carreira.

À Cibele Dias, colega de mestrado e doutorado, por sua disposição absurda em ajudar as pessoas e cuja amizade surgiu em meio ao compartilhamento de conhecimentos e incertezas, elementos tão comuns aos estudantes de pós-graduação.

Ao professor Rosalvo Fogaça, pelos seus ensinamentos, por demonstrar inteligência e paciência infinitas, além de um admirável comprometimento com o ensino.

À Andrielle, grande parceira de laboratórios, tanto em Curitiba quanto em Chicago, com a qual desenvolvi uma amizade para a vida.

A Eduardo Gomes, um conterrâneo nordestino de coração imenso, com uma energia positiva tão grande quanto seu senso de humor.

Ao Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular e às demais pessoas que o compõe: Professora Ilana, Henrique, Gislaine, Edilaine, Cláudio, Marcelo e João, responsáveis por muitas conversas e risadas.

A Flávio Santos, um amigo que surgiu fruto do mestrado em Natal e que foi fundamental no desenvolvimento da idéia inicial desse trabalho, bem como na ajuda do tratamento de alguns dados mesmo anos depois.

Ao professor Bento Abreu, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que possibilitou a análise biomecânica das peles dos animais nesse trabalho.

Às professoras Beata Wolska e Shamim Chowdhury, e ao professor John Solaro, da Universidade de Illinois em Chicago, pela recepção e ajuda para desenvolver experimentos em seu laboratório que contribuíram muito no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores Shane Philips, Yin-Ting Tzen e seus alunos Guilherme Peixoto, Akshay, Varsha e Rudri, que conheci na UIC e ajudaram de maneira substancial para que nossos experimentos pudessem ser concluídos.

Aos membros do Laboratório do professor Luiz Cláudio, especialmente à prof^a Márcia, Stefani Fischer, Dagliane, Sthéfanie Dassi e Juliana, por terem sido tão solícitos no compartilhamento de materiais, no esclarecimento de dúvidas quanto a experimentos e na amizade ao longo dessa minha etapa de formação.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia pelos seus ensinamentos, em especial ao professor Fernando Louzada, cujas provocações sobre didática e atuais modelos de ensino fomentaram em mim a vontade de buscar entender melhor o processo de ensino-aprendizagem e evoluir como futuro professor.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, com quem construí amizades, tive momentos alegres e obtive ajuda em diversas situações: Jefferson, Gláucia, Katlyn, Amanda, Thabata, Natalia, Ana Gabriele, Helena, Juliane Fagotti, Patrícia, Luana, Laís, Adriano, Jéssica, Igor, Leandro, Davidson, Juliane Ceron, Paulo Worfel.

Aos servidores do departamento e do programa de pós-graduação em Fisiologia: Hely, Fábio, Rogério e Roberto, pelo suporte técnico e administrativo nesses últimos anos.

Aos funcionários dos serviços gerais e aos ícones do prédio de Ciências Biológicas da UFPR: seu Luiz e Tião, pela cortesia cotidiana e pelas conversas curtas e bem-humoradas nos momentos de chegada e saída do prédio.

Aos grandes amigos com quem dividi casa e histórias nos primeiros anos em Curitiba: Diego Santana, Maycon, Simon, Tatiana Sepulveda e Tatiana Rocha.

À empresa DMC (São Carlos, BR) pela disponibilização do equipamento de emissão de laser de baixa potência para a realização dos experimentos.

Ao suporte financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através da bolsa de doutorado no Brasil e no exterior, as quais me incentivaram e viabilizaram o desenvolvimento do meu doutorado.

Marinheiro, marinheiro
Quem te ensinou a nadar
Foi o tombo do navio
Ou foi o balanço do mar?

(**Marinheiro Só**, Autor desconhecido,
Domínio Público)

RESUMO

A insuficiência venosa é uma doença caracterizada por dificuldade do retorno venoso e hipertensão venosa. Em situações clínicas mais severas, úlceras cutâneas decorrentes dessa doença surgem nos membros inferiores de pacientes, denominadas úlceras venosas. Essas úlceras são de difícil cicatrização, podendo ficar ativa por meses e anos. Dentre os recursos terapêuticos, o laser de baixa intensidade (LBI) vem sendo considerado como um agente que acelera a cicatrização cutânea. Portanto, o estudo foi dividido em duas etapas com os seguintes objetivos: 1) avaliar as alterações hemodinâmicas da pele em um modelo animal de insuficiência venosa com oclusão total de veia femoral (OVF); 2) avaliar os efeitos do LBI na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos com insuficiência venosa. Na primeira etapa, os ratos (n=14) foram divididos em grupo controle e grupo que passou por cirurgia de OVF e foram avaliados por ultrassonografia com ecodoppler e fluxometria por laser doppler (LDF) antes da cirurgia, após a cirurgia e após 5, 10 e 15 dias. Na segunda etapa, os ratos (n=52) foram divididos em 5 grupos: C (controle), IV (insuficiência venosa), L12 (laser 12 joules), L24 (laser 24 joules), e CL12 (controle laser 12 joules). Os animais dos grupos C e CL12 não foram submetidos à OVF. Os desfechos analisados foram a área da úlcera, atividade de metaloproteinase 2 (MMP-2), quantificação de colágeno e força de ruptura na pele cicatrizada. Como resultados observamos que a veia femoral permaneceu obstruída até o 15º dia após a cirurgia de OVF, o pico de fluxo após hiperemia reativa da microcirculação se apresentou mais baixo no grupo OVF no 10º dia, houve diferença de área de ferimento nos grupos IVC e L24 quando comparados ao controle apenas no primeiro dia após a indução do ferimento, houve maior atividade de MMP-2 no grupo L24 e não houve diferença entre os grupos quanto à distribuição de colágeno e à rigidez da pele em testes biomecânicos. Foi possível concluir que o modelo proposto foi eficaz na oclusão venosa, bloqueando o retorno venoso da veia femoral e reduzindo o fluxo da microcirculação no décimo dia após a cirurgia; e o LBI, nos parâmetros utilizados nesse estudo, não influenciou a taxa de cicatrização das úlceras, assim como a expressão e distribuição de colágeno.

Palavras-chave: Insuficiência venosa. Cicatrização. Metaloproteinase. Laser de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

Venous insufficiency is a disease characterized by difficulty in venous return and venous hypertension. In more severe clinical situations, cutaneous ulcers resulting from this disease arise in the lower limbs of patients, known as venous ulcers. These are hard-to-heal wounds and can be active for several months and years. Among the therapeutic resources, the low-level laser therapy (LLLT) has been considered as an agent that promotes skin healing. Therefore, the study was divided into two stages with the following objectives: 1) to evaluate blood flow changes in a venous insufficiency rat model with unilateral total femoral vein occlusion surgery (FVO); 2) to evaluate the effects of LLLT on wound healing of rats with venous insufficiency. In the first stage, rats (n=14) were divided into control group and group who underwent FVO surgery and they were evaluated by Doppler ultrasonography and Laser Doppler flowmetry (LDF) before surgery, after surgery and after 5, 10 and 15 days. In the second step, rats (n=52) were divided into 5 groups: C (control), IV (venous insufficiency), L12 (laser 12 joules), L24 (24 joules laser), and CL12 (12 joules laser control). The animals of groups C and CL12 were not submitted to FVO. The endpoints analyzed were ulcer area, metalloproteinase 2 activity (MMP-2), collagen quantification and rupture strength in healed skin. As results we observed that the femoral vein remained obstructed until the 15th day after FVO surgery, peak flow after reactive hyperemia of the microcirculation was lower in the FVO group on the 10th day, there was a difference in wound area in groups IV and L24 when compared to the control only on the first day after injury induction, there was greater MMP-2 activity in the L24 group and there was no difference between the groups regarding collagen distribution and skin stiffness in biomechanical tests. We conclude that the proposed model was effective in venous occlusion, blocking the venous return of the femoral vein and reducing microcirculation flow on the 10th day after surgery; and LLLT, in the parameters used in this study, did not influence the healing rate of ulcers, as well as the expression and distribution of collagen.

Keywords: Venous insufficiency. Healing. Metalloproteinase. Low Intensity Laser.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MEMBRO INFERIOR DE PACIENTE COM INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA COM ALTERAÇÕES CUTÂNEAS IMPORTANTES	15
FIGURA 2 – ÚLCERA VENOSA DE MEMBRO INFERIOR	19
FIGURA 3 – CIRURGIA DE OCLUSÃO DA VEIA FEMORAL ESQUERDA.....	30
FIGURA 4 – ULTRASSONOGRAFIA COM ECODOPPLER DE VASOS FEMORAIS PARA VERIFICAÇÃO DE FLUXO SANGUÍNEO	31
FIGURA 5 – LOCAIS ONDE FORAM CAPTURADAS AS IMAGENS DE ECODOPPLER NOS MEMBROS INFERIORES	31
FIGURA 6 – COLETA DOS DADOS DE FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)	32
FIGURA 7 – INDUÇÃO DE FERIMENTO NA PARTE POSTERIOR DO MEMBRO INFERIOR DO RATO.....	34
FIGURA 8 – MENSURAÇÃO DA ÁREA DO FERIMENTO	35
FIGURA 9 – ESQUEMA DEMONSTRANDO A COLETA DA PELE APÓS EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	37
FIGURA 10 – ANÁLISE DE LÂMINA DE PELE CORADA COM PICO SIRIUS RED CAPTADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ POLARIZADA.....	39
FIGURA 11 – AMOSTRA DE PELE PASSANDO POR TESTE DE TRAÇÃO ATÉ A RUPTURA.....	40
FIGURA 12 – IMAGENS DE ULTRASSONOGRAFIA COM ECODOPPLER CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES SEGMENTOS ANALISADOS EM ANIMAL CONTROLE.....	42
FIGURA 13 – IMAGENS DE ECODOPPLER DOS VASOS DE MEMBROS INFERIORES EM RATO CONTROLE	43
FIGURA 14 – IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL QUE PASSOU POR OCLUSÃO DE VEIA FEMORAL (OVF) 5, 10 E 15 DIAS APÓS A CIRURGIA.....	44
FIGURA 15 – ANÁLISE DE FLUXO DE MICROCIRCULAÇÃO DE PELE POR LASER DOPPLER (LDF) POR ESTÍMULO DE HIPEREMIA REATIVA (HR) EM ANIMAL CONTROLE	45

FIGURA 16 – ANÁLISE DE FLUXO DE MICROCIRCULAÇÃO DE PELE POR LASER DOPPLER (LDF) POR ESTÍMULO DE HIPEREMIA POR AQUECIMENTO (HA) EM ANIMAL CONTROLE.....	46
FIGURA 17 – DADOS DE HIPEREMIA REATIVA (HR) OBTIDOS PELA FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)	46
FIGURA 18 – DADOS DE HIPEREMIA POR AQUECIMENTO (HA) OBTIDOS PELA FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)	47
FIGURA 19 – RAZÃO DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS NOS DIFERENTES GRUPOS ANALISADO NOS DIAS 1, 3, 5, 8, 10 E 12 APÓS A INDUÇÃO DO FERIMENTO.....	48
FIGURA 20 – RAZÃO DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E O GRUPO CL12.....	48
FIGURA 21 – ATIVIDADES DE METALOPROTEINASE-2 (MMP-2) E DE SUA PRÓ-ENZIMA (PROMMP-2) NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE...	49
FIGURA 22 – LÂMINAS DE PELE CICATRIZADA DE RATOS CORADAS COM <i>PICRO SIRIUS RED</i> COM AUMENTO DE 10X	50
FIGURA 23 – DISTRIBUIÇÃO DE COLÁGENO POR CORES DE LÂMINAS CORADAS COM <i>PICRO SIRIUS</i>	51
FIGURA 24 – DADOS DE RUPTURA (%) E DO MÓDULO DE YOUNG (UNIDADE ABSOLUTA).....	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – CONDIÇÕES NOS DIFERENTES GRUPOS NA SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO	33
TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO CEAP PARA DOENÇA VENOSA.	16
TABELA 2 – PARÂMETROS DE APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)	36
TABELA 3 – ÁREA DA ÚLCERA EM CENTÍMETROS QUADRADOS	47
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NA DERME EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TOTAL	49
TABELA 5 – ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE-2 EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	- Persulfato de amônio
CEAP	- Classificação Clínica, Etiológica, Anatômica e Patológica
HH	- Hiperemia por Aquecimento (<i>Heating Hyperemia</i>)
IVC	- Insuficiência Venosa Crônica
J	- Joule
LBI	- Laser de Baixa Intensidade
LDF	- Fluxometria por Laser Doppler (<i>Laser Doppler Flowmetry</i>)
MMP	- Metaloproteinase da matriz extracelular
OVF	- Oclusão de Veia Femoral
PSR	- <i>Picro Sirius Red</i>
RH	- Hiperemia reativa (<i>Reactive Hyperemia</i>)
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TEMED	- Tetrametiletilenodiamina (<i>Tetramethylethylenediamine</i>)
TIMP	- Inibidor Tecidual de Metaloproteinase (<i>Tissue Inhibitors of MMPs</i>)
UV	- Úlcera Venosa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	INSUFICIÊNCIA VENOSA	14
1.2	ÚLCERA VENOSA	18
1.2.1	Fisiopatologia	19
1.2.2	Metaloproteinases e a úlcera venosa	20
1.2.3	Tratamento das úlceras venosas	21
1.3	LASER DE BAIXA INTENSIDADE	23
1.4	MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA.....	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	29
3.2	PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DE FLUXO DE VEIA FEMORAL E MICROCIRCULAÇÃO DE PELE.....	29
3.2.1	Cirurgia de Oclusão de veia femoral (OVF).....	30
3.2.2	Avaliação do fluxo dos vasos de membro inferior por Ultrassonografia com Ecodoppler	30
3.2.3	Análise de microcirculação da pele por Laser Doppler (LDF).....	32
3.3	SEGUNDA ETAPA: TRATAMENTO DE ÚLCERAS COM LASER.....	33
3.3.1	Indução de Úlcera.....	34
3.3.2	Mensuração da área da úlcera	34
3.3.3	Tratamento com Laser de Baixa Intensidade (LBI).....	35
3.3.4	Atividade de Metaloproteinases da Pele.....	36
3.3.5	Análise da Composição de Colágeno por Histologia	38
3.3.6	Análise Biomecânica da Pele	39
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	FLUXO DOS VASOS DE MEMBRO INFERIOR.....	42
4.2	MICROCIRCULAÇÃO DA PELE DE MEMBRO INFERIOR	45
4.3	ÁREA DA ÚLCERA	47
4.4	ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE 2 DA PELE	49

4.5	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE COLÁGENO POR HISTOLOGIA	49
4.6	TESTE DE RUPTURA DA PELE	51
5	DISCUSSÃO	52
5.1	O MODELO DE CIRURGIA DE OCLUSÃO DA VEIA FEMORAL E SUAS REPERCUSSÕES CIRCULATÓRIAS	52
5.2	ESTUDO DE ÁREA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE	54
5.3	O PAPEL DA METALOPROTEINASE 2 NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	56
5.4	O REMODELAMENTO DO TECIDO CONJUNTIVO NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	58
5.5	A CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS SOB UMA ÓPTICA BIOMECÂNICA DA PELE REGENERADA	60
6	CONCLUSÕES	62
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A – ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE-2 EM COMPARAÇÃO AO GRUPO CONTROLE	74
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPR	75
	ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UIC	76

1 INTRODUÇÃO

O sistema venoso tem a função de direcionar sangue de tecidos em direção ao coração, para que este seja oxigenado na circulação pulmonar e depois bombeado pelo ventrículo esquerdo, por meio das artérias, de volta aos tecidos. Esse sistema, nos membros inferiores e região pélvica, é anatomicamente subdividido em veias do sistema profundo, que direcionam sangue principalmente dos músculos dos membros; veias do sistema superficial, que capta sangue vindo da microcirculação cutânea; veias perfurantes, que conectam os sistemas superficial e profundo; e veias comunicantes, que conectam veias dentro de um mesmo sistema (superficial com superficial ou profundo com profundo) (CAGGIATI et al., 2002; MEISSNER et al., 2007).

Comparado ao sistema arterial, o sistema venoso apresenta baixas pressões. Caracterizado como um sistema de capacitância, seus vasos possuem camadas mais delgadas, com um tecido menos elástico e camada muscular mais fraca do que o sistema arterial (MEISSNER, 2005). As veias conseguem garantir o fluxo saindo das extremidades em direção ao coração (retorno venoso) por meio de válvulas bicúspides localizadas em seu interior, que permitem a passagem do sangue em uma única direção, auxiliadas pela contração dos músculos esqueléticos adjacentes a esses vasos, formando uma bomba venosa (EBERHARDT; RAFFETTO, 2014), cuja de maior importância no corpo humano encontra-se na panturrilha, formada pelos músculos sóleo e gastrocnêmio. Essa é uma das maneiras que o sangue venoso consegue vencer forças contrárias ao sentido de seu fluxo, como a força gravitacional, e chegar ao seu destino.

No entanto, em algumas situações específicas, a atividade normal desse sistema pode ser afetada por meio do comprometimento de algumas das estruturas supracitadas, levando a disfunções no retorno venoso, formando uma entidade clínica chamada insuficiência venosa.

1.1 INSUFICIÊNCIA VENOSA

A insuficiência venosa é uma doença caracterizada por alterações que dificultam o retorno venoso. O mal funcionamento das válvulas venosas exerce papel importante no mecanismo da doença, gerando hipertensão venosa, estase e refluxo da circulação venosa, bem como alterações morfológicas das paredes dos vasos (BEEBE-DIMMER et al., 2005; EBERHARDT; RAFFETTO, 2014). Tais alterações resultam em uma variedade de manifestações clínicas, como dor, edema, surgimento de veias superficiais de pequeno calibre (telangectasias), estabelecimento de veias tortuosas e disfuncionais, conhecidas como varizes, e o surgimento de ulcerações cutâneas.

As válvulas venosas foram primeiro descritas no século XVI, em veias hepáticas, por Charles Estienne, como estruturas análogas às valvas cardíacas, com função de impedir fluxo retrógrado. No entanto, a descrição dessas válvulas e de sua função foi melhor detalhada no início do século XVII graças aos estudos de Hieronymus Fabricius e William Harvey e, portanto, estes são considerados os pioneiros do conceito contemporâneo de circulação venosa. A descrição de falha das válvulas venosas como geradores de doença foi publicada mais tardiamente, no século XIX, nos estudos de Benjamin Brodie, Karl Kotz e Trendelenburg, demonstrando refluxo venoso consequente de válvulas incompetentes e associando esse achado ao desenvolvimento de veias varicosas (ZERVIDES; GIANNOUKAS, 2012).

Atualmente sabemos que a insuficiência venosa pode ter caráter agudo, devido a algum processo obstrutivo repentino na luz da veia, comprometendo o funcionamento normal das válvulas venosas e gerando altas pressões em curto período, como a trombose venosa profunda; ou caráter crônico (insuficiência venosa crônica, IVC), com quadro de incompetência das válvulas, associado ao enfraquecimento das paredes dos vasos e à manutenção de hipertensão venosa por um período longo, que pode levar a manifestações cutâneas nos membros inferiores (figura 1), características de uma maior gravidade da doença, como hiperpigmentação, lipodermatosclerose, atrofia branca e ulcerações (EBERHARDT; RAFFETTO, 2014).

FIGURA 1 – MEMBRO INFERIOR DE PACIENTE COM INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA COM ALTERAÇÕES CUTÂNEAS IMPORTANTES



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: Pode ser observada a presença de lipodermatoesclerose (atrofia de camadas subcutâneas), hiperpigmentação (dermatite ocre/hemosiderose) e ulceração.

Estima-se que aproximadamente 51% das pessoas apresentem algum grau de IVC (LACROIX et al., 2003) e sua prevalência é maior em países mais industrializados do que em países emergentes (EBERHARDT; RAFFETTO, 2014). Devido a seu caráter crônico, o tratamento dessa doença gera alto gasto em saúde, principalmente quando os achados clínicos são mais graves (RIPPON et al., 2007). Em 2011, o sistema público de saúde brasileiro gastou cerca de 72 milhões de dólares norte-americanos no tratamento de veias varicosas e ferimentos crônicos associados (DE ARAÚJO et al., 2013).

Fatores de risco comuns para o desenvolvimento da doença são idade, histórico familiar, obesidade, tabagismo, traumas em membros inferiores e atividades laborais que dificultem o retorno venoso, tais como ficar parado em pé por longos períodos, agachado ou em assentos altos com os membros inferiores suspensos, dificultando o retorno venoso na região posterior dos membros. Além disso, a IVC também é mais comum em mulheres, numa proporção aproximada de 3:1 (EBERHARDT; RAFFETTO, 2014), principalmente naquelas com histórico de várias gestações e partos (DE ARAÚJO et al., 2013). A ação da progesterona pode ser relevante nessa maior prevalência em mulheres devido à diminuição do tônus da musculatura lisa dos vasos, permitindo maior distensibilidade das veias e

interferindo na função das válvulas venosas (BERGAN; PASCARELLA; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2008).

Para estratificação da doença, a CEAP (tabela 1), uma classificação internacional desenvolvida em 1994 por um comitê do Fórum Venoso Americano, e revisada 10 anos depois, é atualmente a mais utilizada para pessoas com IVC (EKLÖF et al., 2004; PORTER; MONETA, 1995). CEAP é uma sigla em inglês referente à classificação “clínica, etiológica, anatômica e patofisiológica” da IVC. Dessa maneira, o indivíduo tem um rico detalhamento sob a ótica desses quatro aspectos, o que permite uma decisão terapêutica mais precisa. No entanto, a determinação de todos esses parâmetros pode depender de ferramentas mais complexas, exames complementares de imagem, como a ultrassonografia, por exemplo. Portanto, dentre tais parâmetros, a classificação clínica (C) é mais amplamente utilizada, pois depende primordialmente de inspeção e palpação. Ela vai dos números 0 a 6, onde o 0 seria um indivíduo saudável, se apresentando sem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa e o 6 seria um indivíduo com aspecto clínico mais severo, caracterizado pela presença de úlcera venosa ativa de membros inferiores.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO CEAP PARA DOENÇA VENOSA.

(Continua)

Classe Clínica	Descrição
C0	Sem sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa
C1	Telangectasias e ou veias reticulares
C2	Veias varicosas
C3	Edema
C4	Alterações de pele e tecido subcutâneo em função da DVC
C4a	Pigmentação ou eczema
C4b	Lipodermatoesclerose ou atrofia
5	Úlcera venosa cicatrizada
6	Úlcera venosa ativa
S	Sintomático, incluindo dor, aperto, irritação cutânea, sensação de peso e câimbras musculares e outras queixas atribuídas à disfunção venosa
A	Assintomático

Classe Etiológica	Descrição
Ec	Congênito
Ep	Primário
Es	Secundário (pós-trombótico)
En	Causa venosa não-identificada
Classe Anatômica	Descrição
As	Veias superficiais
Ap	Veias perfurantes
Ad	Veias profundas (<i>deep</i>)
An	Localização não-identificada
Classe Patológica	Descrição
Pr	Refluxo
Po	Obstrução
Pr,o	Refluxo e obstrução
Pn	Causa patológica não-identificada

FONTE: Adaptado de EKLOF et al. (2004)

O tratamento da IVC pode ser cirúrgico ou conservador, variando de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas. Em casos mais leves, como em telangectasias ou pequenas veias varicosas, o tratamento principal é a escleroterapia, que consiste na aplicação de substâncias esclerosantes que colapsam as pequenas veias insuficientes (ALDER; LEES, 2015). No entanto, o tratamento mais indicado em pessoas com insuficiência venosa é a terapia compressiva (O'MEARA et al., 2012), por meio da utilização de faixas ou meias nos membros inferiores. A compressão atenua a hipertensão e estase venosa nos membros inferiores, facilitando a função da bomba venosa. Já foi observado que a utilização da terapia compressiva diminui a expressão de marcadores inflamatórios e aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias (BEIDLER et al., 2009). Essa terapia é também indicada para indivíduos que possuam úlcera venosa ativa, como será discutido posteriormente. A principal contraindicação da terapia compressiva é o uso em pacientes que possuam doença arterial obstrutiva periférica associada, devido à dificuldade da perfusão distal de membros inferiores nessa condição.

O exercício físico também vem sendo considerado como parte importante do tratamento de um paciente com IVC, tendo em vista, que nos indivíduos com essa doença é comumente observado diminuição de amplitude de movimento da articulação do tornozelo e fraqueza muscular de sóleo e gastrocnêmio (BACK et al., 1995; DIX; BROOKE; MCCOLLUM, 2003; YANG, 1999) e um protocolo de exercícios objetivando fortalecimento muscular de membros inferiores e flexibilidade de tornozelo possivelmente contribuiriam para melhorar a função da bomba venosa e reduzir a hipertensão e estase venosa. Contudo, de acordo com uma revisão sistemática sobre exercício físico em pacientes com IVC não-ulcerada, a escassa disponibilidade de ensaios clínicos randomizados tendo o exercício como tratamento principal ainda não nos fornece evidências substanciais dos efeitos benéficos dessa terapia em pacientes com doença venosa (ARAUJO et al., 2016).

Em indivíduos que apresentem casos mais graves da IVC, com presença de ulceração cutânea ativa em membros inferiores, o tratamento exige outros cuidados associados, principalmente relacionados ao manejo do ferimento, que serão mencionados a seguir.

1.2 ÚLCERA VENOSA

A úlcera venosa (UV) é a manifestação clínica mais grave da insuficiência venosa, se apresenta com bordas em um padrão indefinido, leito com bastante tecido de granulação (figura 2) e atinge aproximadamente 20% das pessoas com IVC (EBERHARDT; RAFFETTO, 2014). Diferente das úlceras traumáticas, a UV é um ferimento de caráter crônico, que pode perdurar semanas, meses ou anos, possui alta taxa de recidiva e representa cerca de 80% de todas as úlceras de membros inferiores (DE ARAUJO, 2003). Durante a progressão da insuficiência venosa, observam-se alterações da microcirculação representadas pela diminuição do número de capilares associado a alterações morfológicas dos capilares remanescentes que se tornam contorcidos, convolutos e dilatados; concomitantemente, ocorre diminuição da pressão tissular de O₂ local (HOWLADER; SMITH, 2003; INCANDELA et al., 2001; JÜNGER et al., 2000).

FIGURA 2 – ÚLCERA VENOSA DE MEMBRO INFERIOR



FONTE: O autor (2013).

1.2.1 Fisiopatologia

Ainda há discussão sobre os mecanismos que dão origem à UV. Inicialmente, na década de 1920, imaginava-se que a estase de sangue venoso pouco oxigenado causaria hipóxia nos tecidos dos membros inferiores e consequente morte celular (DE TAKÁTS et al., 1929). No entanto essa idéia logo foi confrontada por um estudo publicado no mesmo ano demonstrando que veias de membros inferiores com úlceras apresentaram oxigenação de sangue venoso maior do que membros sem ulceração (BLALOCK, 1929). Apenas décadas depois, em 1982, surgiu a hipótese da barreira de fibrina capilar, que afirmava haver um depósito de fibrina ao redor dos capilares das extremidades de pessoas com IVC, formando uma barreira impedindo a saída de oxigênio e causando a morte de células epiteliais da pele (BROWSE; BURNAND, 1982). Porém, essa última hipótese vem perdendo força para a teoria do encarceramento dos leucócitos, mais aceita atualmente para a fisiopatologia da ulceração venosa (JÜNGER et al., 2000; SMITH, 2006). Essa teoria afirma que a estase venosa, e consequente hipertensão, favorece a marginalização dos leucócitos para as paredes dos vasos. Esse fenômeno é acompanhado de um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais da parede interna dos vasos (RAFFETTO, 2013), promovendo interação endotélio-leucocitária, com consequente infiltração leucocitária por diapedese, ativação dessas células, liberação de citocinas e recrutamento de outras células imunocompetentes, resultando em lesão tecidual.

1.2.2 Metaloproteinases e a úlcera venosa

Dentro do estudo do mecanismo de lesão da úlcera venosa, tem-se destacado a importância das metaloproteinases da matriz (MMPs) no desenvolvimento e cronicidade da úlcera. Atualmente existem 28 tipos de MMPs identificadas (BENJAMIN; KHALIL, 2012) que são sintetizadas por diversas células, em especial fibroblastos. Seus efeitos proteolíticos participam de processos de migração celular, carcinogênese, cicatrização e renovação tissular, pois possuem alta afinidade com componentes estruturais da matriz extracelular (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012). Quando sua cinética de ação está descontrolada, seja por alta síntese ou falta de mecanismos regulatórios, seus efeitos podem ser deletérios, contribuindo para a destruição e perda das propriedades mecânicas normais do tecido conjuntivo (MEYER et al., 2008; MURPHY; NAGASE, 2008). As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma classe de proteinases que degradam a matriz extracelular e fazem parte do processo de regeneração tecidual (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013). Essa classe apresenta subgrupos nomeados de acordo com o substrato de maior afinidade ou localização na célula. A MMP-2 e a MMP-9 são classificadas como gelatinases devido à sua alta afinidade de degradar gelatina e, por isso, também são chamadas de gelatinase A e gelatinase B, respectivamente (MURPHY; NAGASE, 2008). Por isso são enzimas muito investigadas por meio de zimogramas.

A zimografia é uma técnica de análise protéica por eletroforese em gel de acrilamida que permite avaliar a atividade de enzimas catalíticas ao adicionar o substrato da enzima no gel, normalmente gelatina, e posteriormente dar condições de pH e temperatura próximas da ideal para ativar a enzima e permitir que ela exerça sua função (RICCI et al., 2016). A quantificação da atividade enzimática é feita por densitometria de acordo com a intensidade da banda que surge no gel, sendo correspondente à quantidade de substrato que foi degradado pela enzima (HU; BEETON, 2010; SILVA et al., 2014). No ensaio de zimografia, a pró-enzima (uma forma inativa da MMP) apresenta atividade catalítica no gel devido ao processo de renaturação protéica que acontece após a retirada do SDS, permitindo que o sítio ativo da pró-enzima fique exposto ao se renaturar, promovendo o contato com o substrato e sua consequente degeneração (TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012). Isso permite uma análise da atividade total da pró-enzima e de sua isoforma ativa.

Acredita-se que durante a insuficiência venosa ocorra uma ativação anormal de MMPs e um desequilíbrio entre as isoformas, o que conseqüentemente contribuiria para a formação e manutenção da úlcera venosa (BEIDLER et al., 2008; MEYER et al., 2008; MURPHY; NAGASE, 2008; WYSOCKI; STAIANO-COICO; GRINNELL, 1993). As MMPs podem estar envolvidas na ativação de vias em resposta a citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral, e à sinalização iniciada pela ativação de leucócitos (RAFFETTO, 2013). Uma expressão diferente das MMPs 2 e 9 e seus inibidores numa cicatrização normal foi demonstrado com aumento da MMP-9, no início, ligado a infiltração de células inflamatórias e aumento mais tardio da MMP-2 coincidindo com eventos reparativos (DALTON et al., 2005). Wysocki e colaboradores (1993) demonstraram aumento na expressão e na atividade enzimática de metaloproteinases 2 e 9 em úlceras venosas crônicas. Outros autores encontraram atividade global de MMPs aumentadas (MEYER et al., 2008) e expressão aumentada de MMPs 1, 2, 3, 8, 9, 12 e 13 em úlceras venosas, além de baixos níveis dos inibidores teciduais de metaloproteinases, conhecido como TIMPs (RAFFETTO, 2013). Em estudo com pessoas tratadas com terapia compressiva, foi observado redução da atividade das MMPs 3, 8 e 9 em UVs (BEIDLER et al., 2008).

Portanto, as metaloproteinases são marcadores muito investigados nos estudos sobre o comportamento cicatricial de ferimentos crônicos, tendo em vista que seu balanço e regulação podem influenciar fundamentalmente a progressão da cicatrização e, conseqüentemente, o prognóstico do ferimento.

1.2.3 Tratamento das úlceras venosas

O tratamento das úlceras é complexo, exige a atuação de diversos profissionais de saúde, como enfermeiros, médicos, fisioterapeutas e biomédicos. Aproximadamente 20% das úlceras venosas não cicatrizam independente do tratamento (RIPPON et al., 2007). No entanto, apesar de seu caráter crônico e recorrente, as UVs são ferimentos que apresentam maior capacidade de cicatrização quando comparadas às outras ulcerações em membros inferiores de base vascular, como úlceras arteriais e ferimentos do pé diabético. O manejo da UV envolve diversas etapas, iniciando na higiene e aplicação de curativos adequados. O leito do ferimento é um ambiente muito propício para o desenvolvimento bacteriano, portanto essa etapa é imprescindível na prevenção de infecções, que prejudicam a cicatrização e causam

maiores desconfortos aos indivíduos com UV, como dor, hipersecreção e odor na região do ferimento.

Os pacientes com UV geralmente apresentam disfunção da bomba venosa de membro inferior, representada por diminuição da amplitude de movimento do tornozelo e fraqueza dos músculos flexores plantares (BACK et al., 1995; DIX; BROOKE; MCCOLLUM, 2003; YANG, 1999). Uma das estratégias para minimizar essa disfunção de bomba é a terapia compressiva. A compressão é a base do tratamento conservador para pessoas com UV. Apesar de ser uma terapia pouco tolerada pelos pacientes de maneira geral, com aderência de aproximadamente 67% dos pacientes nas primeiras quatro semanas após o início do uso (CATALDO; DE GODOY; DE BARROS, 2012), além de auxiliar na cicatrização do ferimento, a compressão também diminui as chances de recorrência em pessoas com histórico de UV cicatrizada (NELSON; BELL-SYER, 2014), bem como melhora dos sintomas e sinais clínicos (CATALDO; DE GODOY; DE BARROS, 2012).

A terapia compressiva é mais utilizada por meio de enfaixamentos ou meias de baixa, média e alta compressão. Também pode ser aplicada por meio da compressão pneumática intermitente, onde um manguito inflável envolve o membro e o insufla em pequenos intervalos de tempo. Há evidências de que a compressão pneumática intermitente auxilia a cicatrização de UVs em comparação a pessoas que não usaram compressão, porém não há evidências que esse tratamento apresente resultados melhores do que a terapia compressiva por meias ou enfaixamentos (NELSON; HILLMAN; THOMAS, 2014).

Além da compressão, exercícios de alongamento, objetivando o aumento da amplitude de movimento de tornozelo, e de fortalecimento muscular são uma estratégia de tratamento para minimizar a disfunção da bomba venosa e possivelmente favorecer a cicatrização do ferimento. Já foi observado que o exercício é mais eficaz em diminuir o edema do que a posição de Trendelenburg em pessoas com doença venosa (QUILICI et al., 2009) e melhora a hemodinâmica de retorno venoso em pessoas com UV (KAN; DELIS, 2001).

Outra possibilidade terapêutica para o tratamento de úlceras venosas é a utilização de recursos físicos eletrofototerapêuticos, como o uso de radiação ultravioleta, ultrassom terapêutico, terapias com luz LED e laser de baixa intensidade (CULLUM et al., 2001). A radiação ultravioleta é um conhecido método de assepsia em materiais cirúrgicos e de pesquisa. Em ferimentos, sua aplicação objetiva tratar

infecções no leite, no entanto a utilização de antibióticos para o tratamento das infecções bacterianas deixou a aplicação de ultravioleta em desuso, pois essa terapia, apesar de não-invasiva, leva à lesão de DNA que está associada ao envelhecimento prematuro da pele e câncer (MAMALIS; SIEGEL; JAGDEO, 2016). O ultrassom terapêutico é sugerido como adjuvante no processo de cicatrização tecidual há algumas décadas, pois as ondas mecânicas alterariam a permeabilidade da membrana a fatores que acelerariam a atividade cicatricial (DYSON; FRANKS; SUCKLING, 1976; ROCHE; WEST, 1984). No entanto, existem informações conflitantes quanto à efetividade e quanto aos parâmetros de aplicação para o uso do ultrassom nas feridas venosas (CULLUM; AL-KURDI; BELL-SYER, 2010).

Certamente, uma das modalidades de fototerapia mais sugeridas no tratamento de feridas em geral é a aplicação de laser de baixa intensidade. Esse trabalho teve como escopo avaliar a possível eficácia desse tratamento, portanto será explorado com mais detalhes a seguir.

1.3 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A terapia com laser é um recurso utilizado desde a década de 60, inicialmente após um estudo ter verificado que a utilização desse recurso aumentou o crescimento capilar em ratos (CHUNG et al., 2012; HASHMI et al., 2010). O efeito atribuído à aplicação do laser de baixa potência é, de maneira geral, chamado de fotobiomodulação, que consiste na idéia de que a aplicação da luz oriunda do laser sobre moléculas fotossensíveis na célula, chamadas de cromóforos endógenos, leva a respostas biológicas celulares com características não-térmicas e não citotóxicas por meio de eventos químicos (AVCI et al., 2013; MIGNON et al., 2016), diferente do laser de alta intensidade que é abrasivo, com característico aumento de temperatura local e é muito utilizado em cirurgias para remoção de tumores (STAFFORD et al., 2010).

A organela celular mais diretamente envolvida nessa biofotomodulação do laser seria a mitocôndria, com efeitos atribuídos à ativação por luz da enzima citocromo C oxidase (CcO), uma enzima terminal da cadeia respiratória, que participa da transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular (KARU, 2014). A

reatividade da CcO à luz seria devido à sua constituição de quatro centros metálicos para oxirredução (CobreA, CobreB, hemeA e hemeA3)(FARVER et al., 2006). Essa reatividade levaria a um aumento da atividade da cadeia transportadora de elétrons, maior produção de ATP e liberação do óxido nítrico, produzido pela enzima óxido nítrico sintase mitocondrial, por uma dissociação do citocromo causada pela luz, aumento de fluxo sanguíneo, maior liberação de espécies reativas de oxigênio e consequente ativação de cascatas de sinalização envolvidas na migração, adesão e proliferação celulares (AVCI et al., 2013; HASHMI et al., 2010; MIGNON et al., 2016).

Além disso, células relacionadas à imunidade apresentam respostas à aplicação do laser de baixa intensidade, como a degranulação de mastócitos, que irá resultar na liberação de fator de necrose tumoral α e influenciar atividade leucocitária, influenciar na maturação e mobilidade de fibroblastos (sendo estes principais sintetizadores de metaloproteinases), atuar na ativação de linfócitos e aumentar a capacidade fagocitária de macrófagos (CHUNG et al., 2012). Os efeitos nessas células justificam o interesse da terapia com laser na resolução de processos inflamatórios.

A terapia com laser de baixa intensidade também tem sido amplamente utilizada para fins estéticos em dermatologia, como no tratamento de rugas, cicatrizes e queimaduras (AVCI et al., 2013). Inclusive o uso dessa terapia para a cicatrização de ferimentos cutâneos e queimaduras vem sendo investigado desde o início da década de 70, onde foi demonstrado efeito benéfico dessa terapia em feridas traumáticas e queimaduras em ratos (MESTER et al., 1971, 1972). Estudos mais recentes em modelo animal demonstram aceleração do processo cicatricial em ferimentos de ratos diabéticos (DANCÁKOVÁ et al., 2014), em ferimentos pós-cirúrgicos de ratos saudáveis (REIS et al., 2008), queimaduras de terceiro grau (BRASSOLATTI et al., 2016), fibrose de pele (MAMALIS; SIEGEL; JAGDEO, 2016) e até no reparo tecidual de músculo esquelético (FRANÇA et al., 2013).

Em humanos, há relatos de benefícios no tratamento de pé diabético (TCHANQUE-FOSSUO et al., 2016), em úlceras de pele sem etiologia definida (KUBOTA, 2004), porém sem resultado benéfico adicional em úlceras venosas (LECLERE et al., 2010). No entanto, estudos de revisão sobre o efeito da laserterapia na cicatrização de ferimentos demonstram que as evidências disponíveis apresentam algumas controvérsias devido à clareza do mecanismo de ação da terapia (POSTEN et al., 2006), da escolha e descrição detalhada da dosimetria utilizada e dos desenhos

dos estudos em relação à tamanho de amostra e tempo de aplicação (DA SILVA et al., 2010; DE LIMA et al., 2016; HASHMI et al., 2010; JENKINS; CARROLL, 2011).

A etiologia do ferimento deve ser um aspecto fundamental no desenho do estudo, tendo em vista que os marcadores de reparo tecidual podem se comportar de maneira distinta de acordo com a causa da lesão. Uma ferida arterial possui características bem distintas de úlceras de origem venosa, por exemplo, mesmo ambas apresentando comprometimento vascular como base para a origem do ferimento. Portanto, consideramos que há necessidade da realização de mais estudos pré-clínicos com parâmetros físicos de laser bem definidos e em feridas com etiologia específica, no intuito de que a dose terapêutica seja melhor definida e venha a facilitar o desenvolvimento de estudos clínicos futuros envolvendo seres humanos.

1.4 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA INSUFICIÊNCIA VENOSA

No estudo das doenças vasculares, a utilização de modelos animais é importante no intuito de conhecer a evolução da fisiopatologia desde os estágios iniciais da doença. No entanto, desenvolver situações que apresentem características fisiopatológicas semelhantes às doenças humanas se configura um desafio, pois as condições anatômicas e hemodinâmicas podem se demonstrar muito distintas e pouco conhecidas, dependendo do modelo utilizado. Estudos investigando mais especificamente doenças venosas vem crescendo nos últimos 20 anos (BERGAN; PASCARELLA; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2008; DALRING et al., 1998; KAWADA; ISHII, 2008; LALKA; UNTHANK; NIXON, 1998) e reforçando evidências de um cenário inflamatório na progressão da IVC.

Na década de 1970, foram realizados estudos pré-clínicos de trombose venosa em animais, principalmente cães, que consistia na aplicação de torniquetes para o bloqueio do fluxo venoso femoral (DALRING et al., 1998), no entanto tal procedimento acarretava uma alta mortalidade dos animais, aproximadamente 30%. Na década de 1980, foi desenvolvido uma técnica cirúrgica para hipertensão venosa em ratos Wistar por meio de uma fístula arteriovenosa, fazendo com que a alta pressão arterial penetre no sistema venoso causando refluxo (VAN BEMMELEN et al., 1986) e incompetência de válvulas venosas, que foi reportado já no primeiro dia de observação pós-cirúrgica.

Contudo, está técnica também apresenta uma taxa de mortalidade considerável, de 25% nas primeiras 36 horas, por insuficiência cardíaca causada pelos efeitos após o procedimento cirúrgico. Doze anos após esse último estudo, um novo modelo foi publicado, que consistia em obstruir a veia cava distal e as veias ilíacas comuns e femorais bilateralmente para analisar pressão venosa e adesão leucocitária durante 135 minutos e, para tal, o animal permanecia anestesiado e com ventilação invasiva durante esse tempo (LALKA; UNTHANK; NIXON, 1998), se caracterizando como um procedimento cirúrgico complexo, extenso e que permitia observações a curto prazo.

Considerando a associação da IVC severa com ulcerações cutâneas, julgamos relevante investigar, em modelo animal, a evolução da cicatrização de um ferimento em um membro com insuficiência venosa. Os modelos disponíveis para feridas são muito diversos, utilizando coelhos, porcos, ratos e camundongos, para avaliar úlceras de pressão, isquêmicas, diabéticas e infectadas (NUNAN; HARDING; MARTIN, 2014). Entretanto, verificamos uma ausência de investigação de uma úlcera de base venosa em modelo animal.

No presente estudo, objetivamos realizar, em ratos Wistar, uma obstrução unilateral do fluxo venoso na veia femoral esquerda acima do nível da veia epigástrica superficial e associar esse modelo de insuficiência venosa a um ferimento na pata esquerda do animal no intuito de mimetizar as condições de uma úlcera venosa de membro inferior. O escopo foi uma avaliação a longo prazo, por aproximadamente 25 dias, e alguns desses animais tendo seus ferimentos tratados com laser de baixa intensidade para observar o comportamento de cicatrização e a resposta diante desse recurso fototerapêutico.

Como uma ferramenta na avaliação inicial desse modelo de obstrução de fluxo venoso, o ecodoppler é fundamental para analisar a presença de fluxo em veias importantes, como a veia femoral. Esse exame consiste na verificação da velocidade de fluxo sanguíneo por meio da diferença de frequência entre ondas ultrassônicas que foram emitidas por um transdutor e os ecos que retornam após o contato dessas ondas com as células do sangue circulante (WELLS, 1990). Com alguns ajustes de frequência do transdutor, essa avaliação pode ser feita tanto em vasos calibrosos de humanos como em vasos de diâmetro bem menor em pequenos animais, como ratos e camundongos (HARTLEY et al., 2011). Dessa maneira, o ecodoppler é capaz de fornecer dados objetivos quanto às características de fluxo nos animais do modelo proposto nesse trabalho.

Não obstante, a fisiopatologia das úlceras venosas também envolve mudanças de microcirculação. Essas alterações são provavelmente o principal mecanismo que acarreta a lesão tecidual em indivíduos com IVC severa. Portanto, a mensuração e o monitoramento do fluxo sanguíneo na microcirculação cutânea também se caracterizam como uma variável imprescindível a ser observada nesse modelo animal. Esses dados de microcirculação podem ser obtidos por meio da fluxometria por Laser Doppler (LDF), uma técnica não-invasiva que consiste na avaliação do fluxo cutâneo numa profundidade de 1 a 1,5 mm abaixo da epiderme (BRAVERMAN, 2000). A obtenção dos dados do LDF se dá por um feixe de laser transmitido para pele através de um cabo de fibra ótica; a luz refletida nos eritrócitos em movimento dos vasos da microcirculação é captada de volta no instrumento e transduzida em milivolts (BRAVERMAN; KEH; GOLDMINZ, 1990). Dessa maneira, essa ferramenta é utilizada no estudos de doenças com componente microcirculatório como a psoríase (BRAVERMAN, 2000), diabetes mellitus (SÖRENSEN et al., 2016) e a esclerose sistêmica (PARTOVI et al., 2014). Além disso, a técnica também permite avaliar variações microcirculatórias diante de estressores como o frio (EDWARD POLLOCK et al., 1993), calor (BRUNT et al., 2016a) e hiperemia reativa após pressão isquêmica (BRUNT et al., 2016b).

Diante do desenvolvimento de um modelo de obstrução venosa de membros inferiores, de ferramentas de análise que possam mensurar as consequências dessa obstrução (ecodoppler e LDF), associado à presença de um ferimento cutâneo no mesmo membro onde foi gerado esse déficit de fluxo vascular e da aplicação de uma terapêutica que possivelmente tem a função de aprimorar a cicatrização, (laser de baixa intensidade), objetivamos obter evidências que fortaleçam o conhecimento da insuficiência venosa crônica em sua condição mais grave no intuito de contribuir para aprimorar o manejo dessa doença em situações futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações hemodinâmicas de pele em um modelo animal de insuficiência venosa e os efeitos do laser de baixa intensidade na cicatrização de úlceras cutâneas de pata traseira em ratos com insuficiência venosa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a presença/ausência de fluxo sanguíneo de veia femoral após cirurgia de oclusão desse vaso em ratos.

Avaliar as repercussões de microcirculação cutânea na região posterior da coxa de ratos após cirurgia de oclusão de veia femoral.

Avaliar parâmetros morfométricos de úlceras em ratos com insuficiência venosa diante da aplicação de laser de baixa intensidade de comprimento de onda de 660nm, com energia total de aplicação de 12J e 24J.

Avaliar atividades de metaloproteinase 2 nas úlceras e/ou tecido cicatricial em ratos com insuficiência venosa tratados com laser de baixa intensidade.

Avaliar a disposição de fibras colágenas em tecido de pele após cicatrização de ferimentos tratados com laser de baixa intensidade.

Avaliar a biomecânica da pele cicatrizada por meio de teste de ruptura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo longitudinal pré-clínico com 66 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, pesando entre 250 e 300 gramas, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas/12 horas, com livre acesso à água e ração.

O estudo foi realizado em duas etapas distintas: a) avaliação de fluxo venoso e microcirculação da pele após cirurgia de oclusão total de veia femoral (OVF) e b) tratamento de feridas com laser de baixa intensidade em modelo de úlcera venosa (combinação de OVF e lesão cutânea na pata traseira). A primeira etapa foi realizada no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Illinois em Chicago (UIC), Estados Unidos e a segunda etapa realizada nos laboratórios da Contração Muscular e de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular do departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, Brasil. Em todos os locais, os procedimentos envolvendo manipulação animal seguiram as recomendações para utilização de animais em pesquisa e foram previamente aprovados pelos respectivos comitês de ética em pesquisa animal das Instituições (ver anexo A e anexo B).

Todas as regiões da pele dos animais que envolveram procedimentos cirúrgicos e/ou de avaliação foram tricotomizados e passaram por assepsia previamente ao procedimento cirúrgico.

3.2 PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DE FLUXO DE VEIA FEMORAL E MICROCIRCULAÇÃO DE PELE

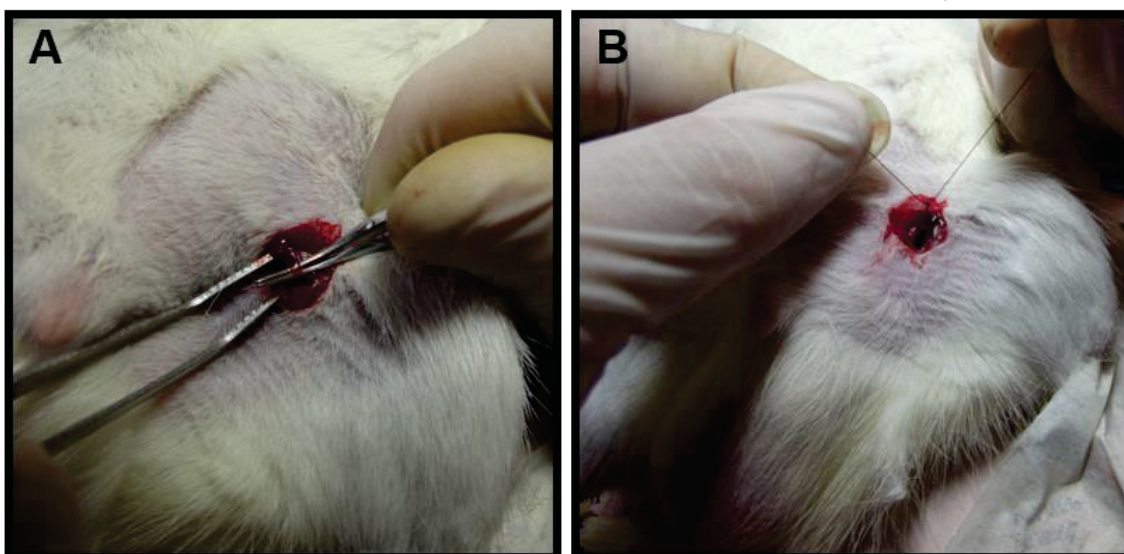
Nessa primeira etapa, foram utilizados 14 ratos, que foram divididos em dois grupos: grupo OVF e grupo controle. Esses animais passaram por dois métodos de análise: a) avaliação do fluxo venoso dos membros inferiores através de ecodoppler e b) avaliação da microcirculação da pele íntegra na região posterior da pata esquerda, local onde o ferimento foi induzido nos animais da segunda etapa. Todos os procedimentos realizados nos dois grupos da primeira etapa estão descritos detalhadamente a seguir. O objetivo da primeira fase foi verificar ausência de fluxo femoral acima do local da obstrução em três momentos distintos (5, 10 e 15 dias após

a cirurgia de OVF) por meio de ultrassonografia com ecodoppler; e verificar repercussões do procedimento cirúrgico na microcirculação cutânea da parte posterior do membro por meio de fluxometria por laser doppler em quatro momentos (no dia da cirurgia, 5, 10 e 15 dias após a OVF).

3.2.1 Cirurgia de Oclusão de veia femoral (OVF)

Para mimetizar a condição de insuficiência venosa de membros inferiores, foi realizada cirurgia de oclusão total da veia femoral (OVF) esquerda dos ratos de ambos os grupos. Sob anestesia, foi feita uma incisão na região inguinal, a veia femoral foi separada da artéria femoral e o fluxo venoso foi totalmente obstruído logo acima da anastomose da veia epigástrica superficial, através de ligação com fio de sutura de seda (4.0) ao redor da veia (figura 3). No dia da cirurgia até 48h após, foi administrado uma dose de 0,1 mg/kg de buprenorfina a cada 12h, de acordo com as recomendações do comitê de ética animal para a recuperação do procedimento cirúrgico.

FIGURA 3 – CIRURGIA DE OCLUSÃO DA VEIA FEMORAL ESQUERDA



FONTE: O autor (2018).

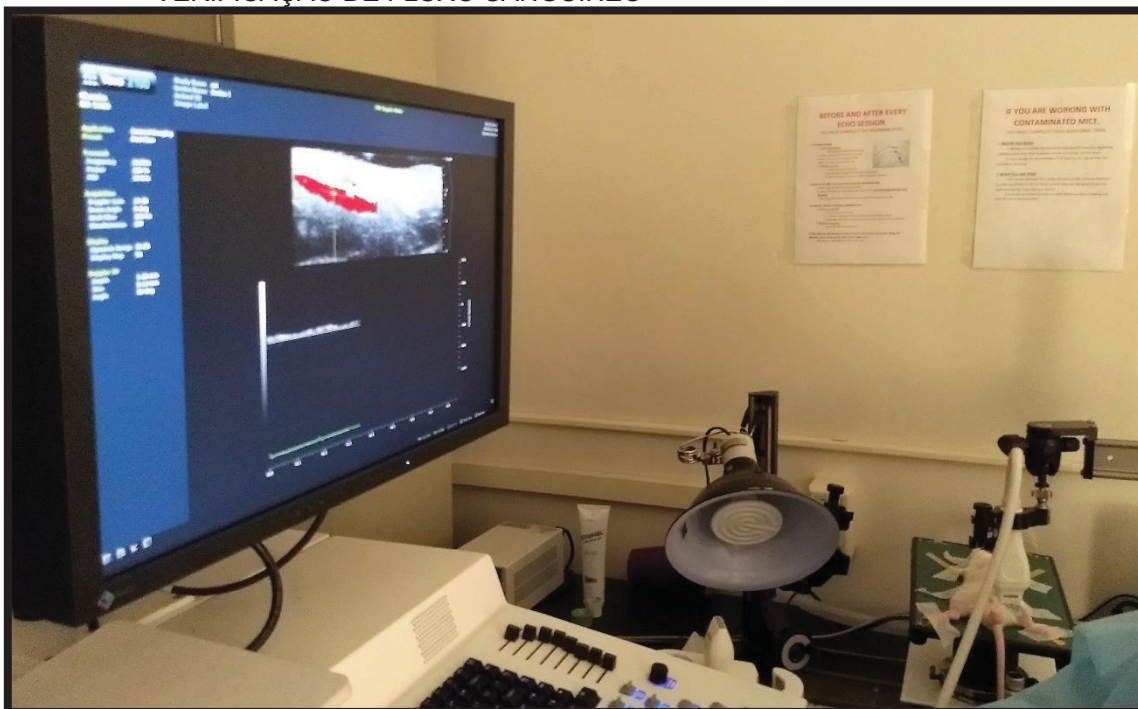
LEGENDA: A: Dissecação da veia femoral. B: oclusão total do fluxo venoso com fio de sutura.

3.2.2 Avaliação do fluxo dos vasos de membro inferior por Ultrassonografia com Ecodoppler

Foi realizado análise de ultrassom com ecodoppler, por uma profissional devidamente treinada (Shamim Chowdhury, MD, PhD – UIC), para a verificação do fluxo venoso nos membros inferiores em 4 momentos distintos: antes da OVF e 5, 10

e 15 dias após a OVF. Os animais eram anestesiados com isoflurano e ambos membros inferiores foram avaliados por aproximadamente 20 minutos com o equipamento *Vevo® 2100 Imaging System (Fujifilm VisualSonics)*, utilizando o transdutor MS550D (frequência 22-55MHz), específico para estudos em pequenos animais (figura 4).

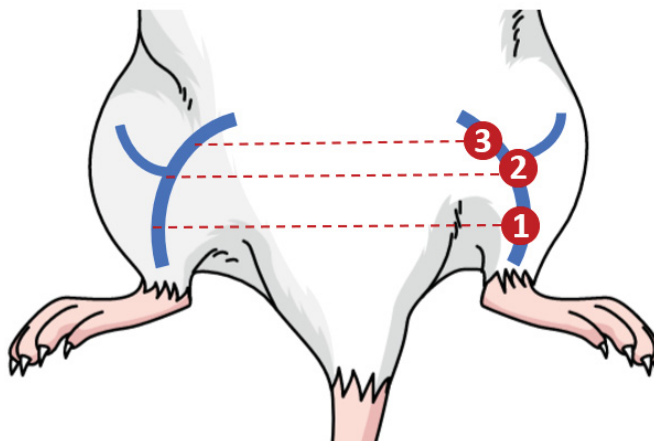
FIGURA 4 – ULTRASSONOGRAFIA COM ECODOPPLER DE VASOS FEMORAIS PARA VERIFICAÇÃO DE FLUXO SANGUÍNEO



FONTE: O autor (2018).

Em cada animal, a análise era feita em três segmentos em ambos membros inferiores, como demonstrado na figura 5.

FIGURA 5 – LOCAIS ONDE FORAM CAPTURADAS AS IMAGENS DE ECODOPPLER NOS MEMBROS INFERIORES



FONTE: O autor (2018).

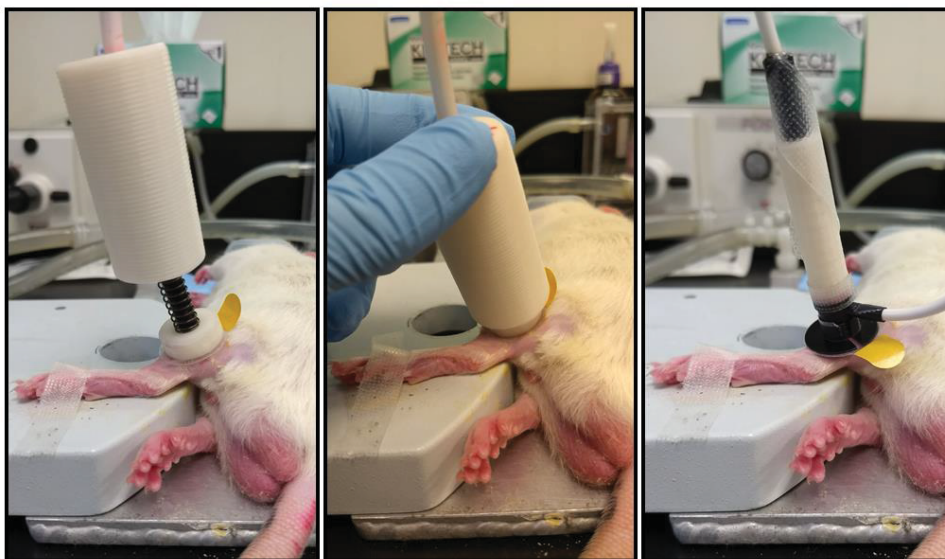
LEGENDA: No ponto 1, foi avaliado o fluxo distal da veia safena; no ponto 2 foi avaliado o fluxo proximal da veia safena e da veia epigástrica superficial; no ponto 3 foi avaliado o fluxo da veia femoral.

3.2.3 Análise de microcirculação da pele por Laser Doppler (LDF)

A microcirculação da pele foi mensurada por meio de fluxometria por Laser Doppler (*Laser Doppler Flowmetry*, LDF) (LAL; UNNI, 2015) na região posterior do membro inferior esquerdo (coxa) como demonstrado na figura 6, com o equipamento *Laser Doppler Monitor* (*Moor Instruments*) acoplado ao *PowerLab* (*ADI Instruments*) e ao software *LabChart* (*ADI Instruments*). Para o procedimento, os ratos foram inicialmente anestesiados com isoflurano e foi aplicado dois protocolos diferentes de coleta:

- a) **Hiperemia reativa (HR):** consistia na coleta do fluxo basal por 2 minutos, posteriormente aplicação de pressão de 60 mmHg por 5 minutos na região avaliada por meio de mecanismo acoplado ao transdutor. Logo após, a pressão era liberada e o fluxo continuava sendo registrado por mais dois minutos.
- b) **Hiperemia por aquecimento (HA):** consistia na coleta do fluxo basal por 2 minutos, posteriormente a região mensurada era aquecida até 41°C por meio de um aquecedor específico acoplado ao transdutor e o fluxo era registrado por 5 minutos. Após o aquecimento, o fluxo era registrado por mais 2 minutos.

FIGURA 6 – COLETA DOS DADOS DE FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: À esquerda, observamos o transdutor para coleta de hiperemia reativa. Ao centro, o mesmo transdutor sendo utilizado para exercer pressão sobre a região coletada. À direita, observamos o transdutor que eleva a temperatura local até 41°C e registra as alterações de microcirculação simultaneamente.

Os dados obtidos eram captados em milivolts em função do tempo, por meio dos transdutores do equipamento de LDF. Posteriormente esses dados eram exportados em tabelas e foram tratados no software *MATLAB (MathWorks®)* com um código de programação para o cálculo das variáveis quantidade máxima de fluxo registrado (pico de fluxo) e o tempo para atingir esse pico (tempo para o pico de fluxo).

3.3 SEGUNDA ETAPA: TRATAMENTO DE ÚLCERAS COM LASER

Todos os animais dessa segunda etapa passaram por indução de úlcera na parte posterior da coxa esquerda (explicado com detalhes posteriormente). Em alguns animais, 10 dias antes do ferimento, foi realizada cirurgia de oclusão da veia femoral (OVF) esquerda. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=52), da seguinte maneira:

- a) Grupo IV (insuficiência venosa, n=12): animais que passaram por cirurgia de OVF e indução de úlcera.
- b) Grupo L12 (laser 12, n=12): animais que passaram por cirurgia de OVF, indução de úlcera e tratamento com Laser de Baixa Intensidade (LBI) para as úlceras, com dose de 12J (dosimetria detalhada na tabela 2).
- c) Grupo L24 (laser 24, n=12): animais com condições semelhantes ao grupo L12, porém com dose de LBI de 24J.
- d) Grupo CL12 (controle laser 12, n=8): animais que passaram por indução de úlcera, foram tratados com LBI, dose 12J, porém sem OVF.
- e) Grupo C (controle, n=8): animais que apenas passaram por indução de ferimento, sem OVF e sem cirurgia.

As informações quanto aos procedimentos realizados em cada grupo estão resumidas no quadro 1 abaixo.

QUADRO 1 – CONDIÇÕES NOS DIFERENTES GRUPOS NA SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO

Grupo	Úlcera	Cirurgia OVF	LBI 12J	LBI 24J
IV	✓	✓	-	-
L12	✓	✓	✓	-
L24	✓	✓	-	✓
CL12	✓	-	✓	-
C	✓	-	-	-

FONTE: O autor (2018)

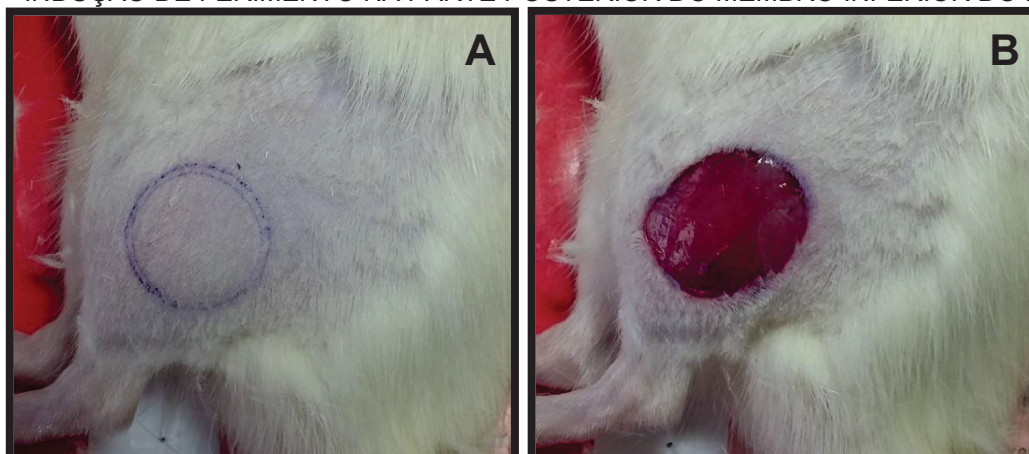
LEGENDA: OVF: oclusão de veia femoral, LBI: laser de baixa intensidade; J: joules

A cirurgia de OFV foi feita de acordo com o descrito na primeira etapa (ver item 3.2.1). Os procedimentos envolvendo o grupo CL12 foram realizados após a conclusão dos demais grupos.

3.3.1 Indução de Úlcera

Em todos os grupos, foi realizado indução de ferimento cutâneo (úlceras) na região posterior do membro inferior esquerdo (coxa) do animal. A região era tricotomizada, marcada com objeto circular para delimitar a área e, seguidamente, a pele era retirada com tesoura, seguindo o contorno da marcação (Figura 7). Esse procedimento era realizado no décimo dia após a cirurgia de OVF, no mesmo membro onde o vaso foi ocluído.

FIGURA 7 – INDUÇÃO DE FERIMENTO NA PARTE POSTERIOR DO MEMBRO INFERIOR DO RATO



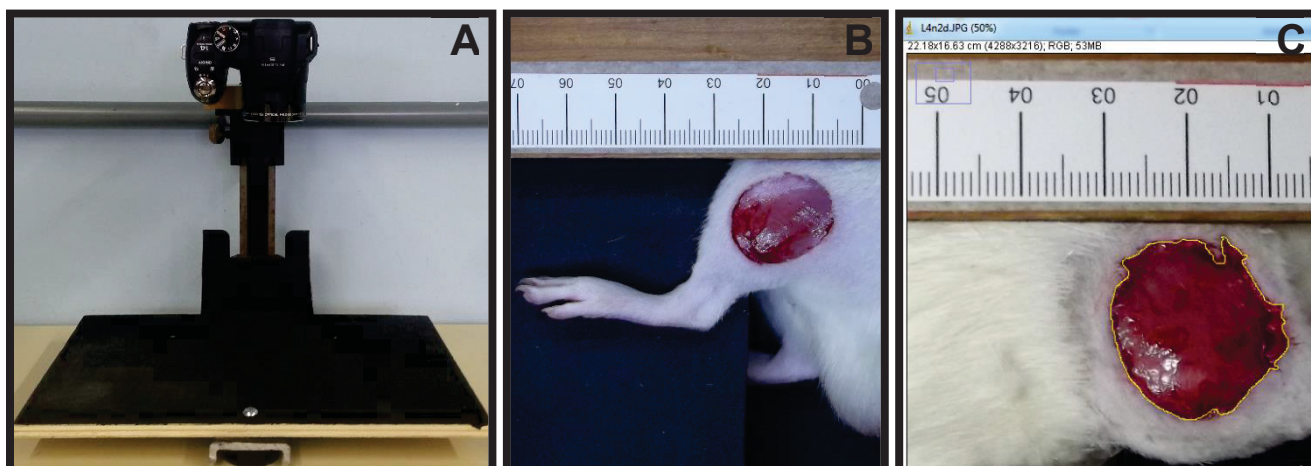
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A: marcação com objeto circular para delimitação de área. B: Ferimento realizado com tesoura para retirada da pele, seguindo o contorno da marcação na pele.

3.3.2 Mensuração da área da úlcera

O ferimento foi fotografado em 7 momentos diferentes: dias 0 (indução), 1, 3, 5, 8, 10 e 12. As fotografias foram feitas com escala métrica ao lado do ferimento e em um suporte adaptado com iluminação para acoplar a câmera (Fujifilm, modelo FinePix S2980) (Figura 8). Depois de transferidas para um computador, as fotografias foram analisadas para cálculo de área no *software ImageJ 1.46 (National Institutes of Health)* através de seleção manual da área. Foram analisados os dados de área em centímetros quadrados e em valores de porcentagem de cicatrização (razão de cicatrização).

FIGURA 8 – MENSURAÇÃO DA ÁREA DO FERIMENTO



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A: suporte adaptado para acoplar a câmera. B: fotografia de um ferimento com escala métrica obtida com a câmera no suporte. C: captura de tela do software ImageJ demonstrando a seleção da área da ferida a ser mensurada (traçado amarelo ao redor do ferimento).

3.3.3 Tratamento com Laser de Baixa Intensidade (LBI)

Um dia após a indução do ferimento, era iniciado o tratamento com Laser de Baixa Intensidade (LBI) nos grupos L12 e L24. O tratamento consistiu em 10 aplicações de laser por 2 semanas, sendo 5 aplicações por semana. A aplicação do LBI se dava ao redor das bordas do ferimento. Durante a primeira semana, a dose do LBI era aplicada distribuída em 6 diferentes locais (pontos) ao redor do ferimento, enquanto na segunda semana, a dose era distribuída em 3 pontos. Esse ajuste de quantidade de pontos foi feito em vista do processo de cicatrização e diminuição da área da ferida.

O equipamento utilizado foi o Photon Lase III (DMC, Brasil) e os parâmetros de dose utilizados estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 – PARÂMETROS DE APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

Parâmetros	Grupo L12	Grupo L24
Comprimento de onda	660 nm	660 nm
Modo de aplicação	contínuo	contínuo
Potência	100 mW	100 mW
1ª semana		
Densidade de energia por ponto	0,2 J	0,4 J
Número de pontos	6	6
Tempo de aplicação por ponto	2 s	4 s
Tempo total de aplicação	12 s	24 s
Dose por dia	1,2 J	2,4 J
Dose total (5 aplicações)	6 J	12 J
2ª Semana		
Densidade de energia por ponto	0,4 J	0,8 J
Número de pontos	3	3
Tempo de aplicação por ponto	4 s	8 s
Tempo total de aplicação	12s	24 s
Dose por dia	1,2 J	2,4 J
Dose total (5 aplicações)	6 J	12 J

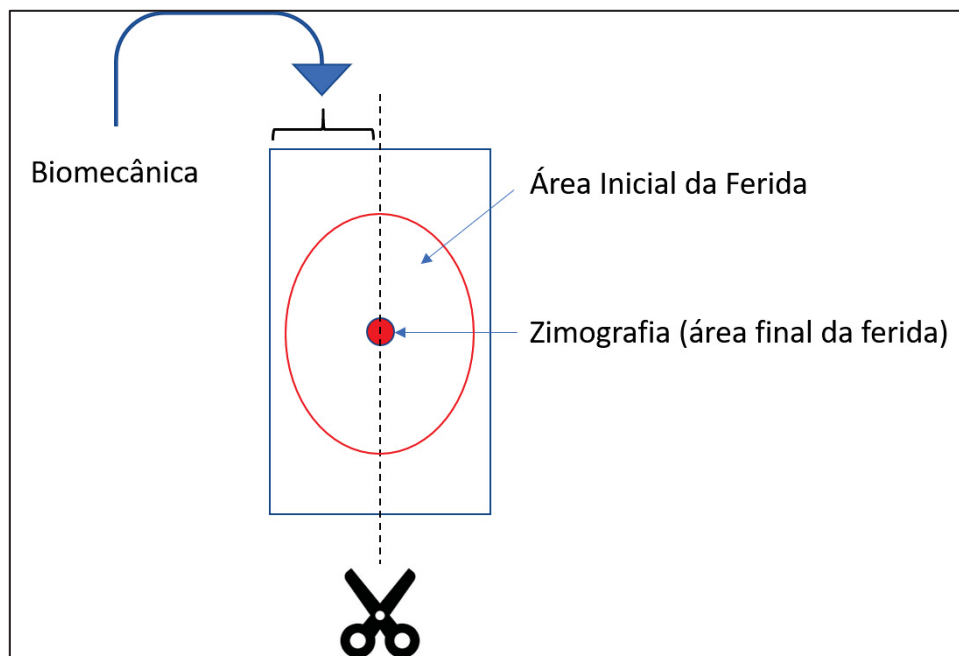
FONTE: O autor (2018).

3.3.4 Atividade de Metaloproteinases da Pele

Após a eutanásia, um fragmento de pele da região onde havia sido feito o ferimento foi coletada para zimografia, como demonstrado na figura 9, congelada imediatamente com nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer -80°C até o dia do ensaio. A atividade enzimática de metaloproteinase 2 (MMP-2) foi quantificada através da técnica de zimografia (LA ROCCA et al., 2004; SILVA et al., 2014; TAJHYA; PATEL; BEETON, 2017; TOTH; SOHAIL; FRIDMAN, 2012) a partir dos tecidos de pele coletados. Para isso, as amostras foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (composto por 50mM Tris-HCl a pH 7,4; 3,1mM de sacarose e 0,1% Triton X-100) com o auxílio de um sonicador, posteriormente foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm e passaram por quantificação de proteínas por método Bradford (BRADFORD, 1976) feito de acordo com a absorbância da amostra após interação com reagente composto por corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, etanol e ácido fosfórico, para determinar a quantidade a ser depositada no poço do gel. Por fim, 50 µg de proteína foram depositadas em cada poço, com tampão

de amostra *Laemli*, e separadas por eletroforese por aproximadamente duas horas, a 100 V e limitados a 35 ampere por gel.

FIGURA 9 – ESQUEMA DEMONSTRANDO A COLETA DA PELE APÓS EUTANÁSIA DOS ANIMAIS



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Um fragmento retangular (demonstrado em contorno azul) era inicialmente retirado, metade desse material, demarcado pela linha pontilhada, foi armazenado para os ensaios biomecânicos de ruptura e uma porção central da outra metade foi homogeneizada para os ensaios de zimografia.

As amostras foram depositadas em géis de poliacrilamida na concentração de 8% de Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 contendo 1mg/ml de gelatina, 1,5M Tris (pH 8,8), 1% APS, 0,1% TEMED, 1% SDS. O gel de empacotamento utilizado foi de concentração de 5%, contendo 1,5M Tris (pH 6,8), 1% APS, 0,1% TEMED, 1% SDS. As proteínas foram separadas sob corrente contínua de 100 volts em tampão com as seguintes concentrações: 192mM Glicina; 25mM Tris; 0,1% SDS.

Após eletroforese, os géis foram imersos em Solução de Triton (2,5% Triton X-100; 50mM Tris, pH 7,4; 5mM CaCl_2), para remoção do SDS, e colocados no agitador por 1 hora com troca de solução a cada 20 minutos. Em seguida, os géis foram imersos em Solução de Incubação [50mM Tris (pH 7,4); 5mM CaCl_2 ; 150mM NaCl], para ativação das MMPs a uma temperatura de 37°C por 19 horas. Após a incubação, foi realizada a coloração com Corante Coomassie Blue (0,5% Coomassie blue em 30% metanol e 10% Ácido acético). Os géis foram submersos no corante por 30 minutos, em agitação. Em seguida, foi realizada a descoloração (35% Metanol; 10% Ácido

Acético), durante 20 minutos e depois os géis foram colocados em água destilada até a digitalização.

Para análise densitométrica, os géis foram digitalizados e a determinação da atividade enzimática das MMPs foi determinada pela intensidade das bandas claras contra um fundo azul (nível de degradação) e identificada de acordo com a massa molecular conforme descrito anteriormente (SILVA et al., 2014; SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005; WYSOCKI; STAIANO-COICO; GRINNELL, 1993) no software *ImageJ 1.46* (NIH). Os dados são obtidos em unidades arbitrárias baseado na quantidade de *pixels* da imagem. A intensidade das bandas dos grupos IV, CL, L12 e L24 foram normalizadas de acordo com uma banda referente a um *pool* de amostras de 5 animais do grupo controle (grupo C) para demonstração em porcentagem de acordo com o seguinte cálculo:

$$\%MMP2 = 100 \times \left(\frac{\text{expressão de MMP2}}{\text{expressão de MMP2pool}} \right)$$

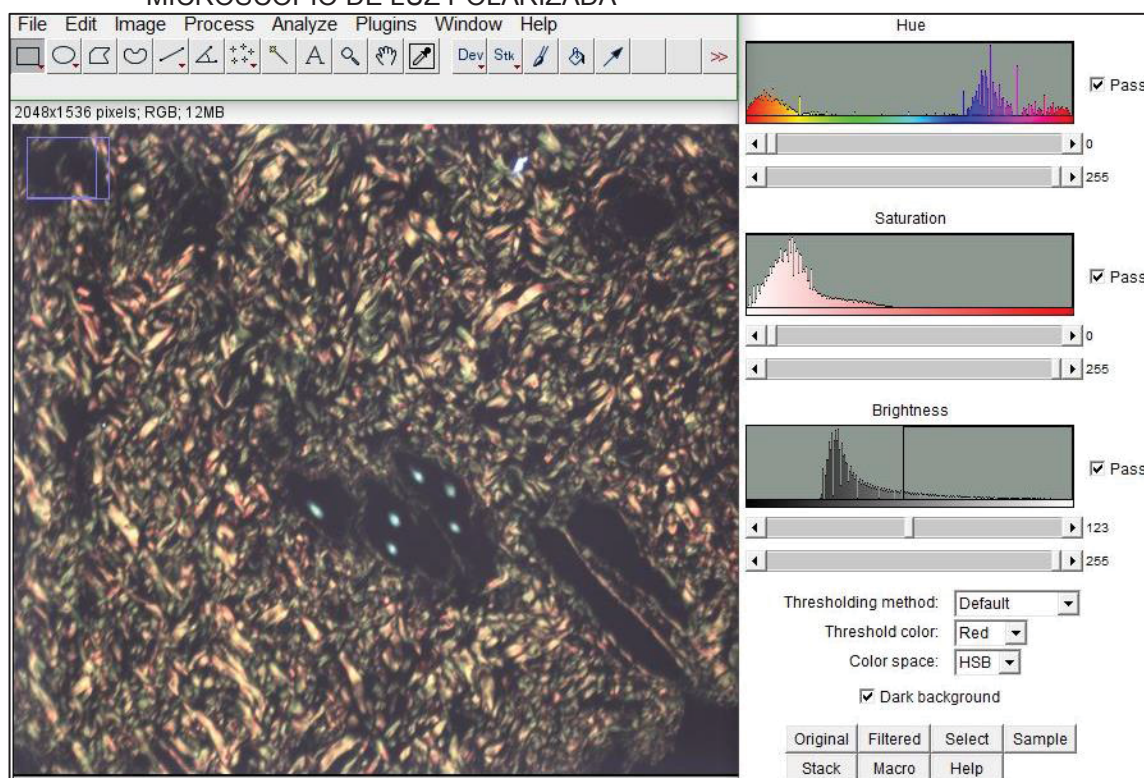
3.3.5 Análise da Composição de Colágeno por Histologia

Um fragmento da pele da região onde foi feito o ferimento também foi coletado para análise histológica da quantidade de colágeno na derme. As amostras foram fixadas em formalina 10%, desidratadas, emblocadas, cortadas (7 µm) e montadas em lâminas histológicas posteriormente coradas com Hematoxilina-eosina e Picro Sirius red (PSR) por protocolos convencionais. O registro fotográfico das lâminas foi feito em microscópio de luz polarizada (marca Nikon, modelo Eclipse E 200), com câmera digital (Biocam). Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de colágeno e a espessura das fibras, de acordo com método previamente descrito (AIKAWA et al., 2006; RICH; WHITTAKER, 2005; SILVA et al., 2017).

As fibras de colágeno, quando coradas com PSR e analisadas sob luz polarizada, apresentam coloração distinta de acordo com sua espessura e o tipo de colágeno, variando da cor verde (colágeno tipo III, mais delgado), para o amarelo, laranja e para o vermelho (colágeno tipo I, mais espesso, respectivamente) (HISS et al., 1988; JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982). As imagens das lâminas foram analisadas no *ImageJ 1.46* (*National Institutes of Health*), por meio das cores dos pixels, onde foi gerado um

histograma de 256 cores possíveis (figura 10), separadas de acordo com os seguintes intervalos: vermelho de 2-9 e 230-256, laranja de 10-38, amarelo de 39-51 e verde de 51-128 (RICH; WHITTAKER, 2005). Quando uma cor específica era destacada dentro do histograma de cores, a área formada por todos os pixels daquele determinado intervalo era selecionada e quantificada, para depois ser transformada em porcentagem em relação à quantidade total de pixels de todos os intervalos somados.

FIGURA 10 – ANÁLISE DE LÂMINA DE PELE CORADA COM PICO SIRIUS RED CAPTADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ POLARIZADA



FONTE: O autor (2018).

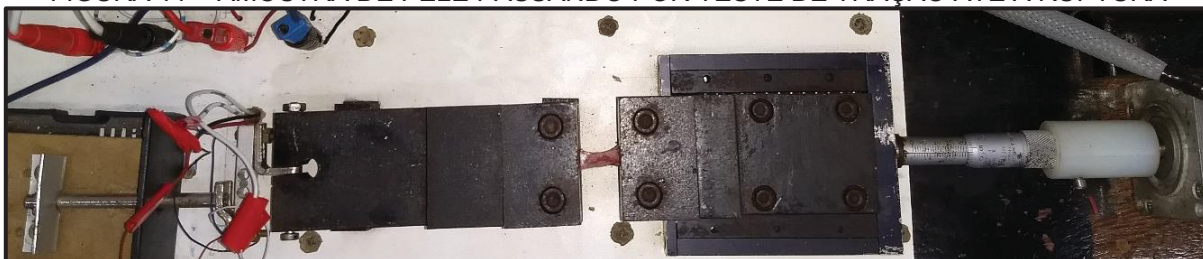
LEGENDA: Podemos observar no canto superior direito o histograma de cor (*Hue*) gerado pelo *ImageJ* (comando: *Image>Adjust>Color Threshold*) que permite selecionar o espectro de cores a serem quantificadas.

3.3.6 Análise Biomecânica da Pele

A pele cicatrizada do ferimento foi analisada em teste de tração até a ruptura com equipamento adaptado (figura 11), como descrito anteriormente (SILVA et al., 2013c). O sistema era formado por um motor de passo controlado automaticamente para gerar deslocamento, uma escala micrométrica para medir o deslocamento, aparato de fixação do material biológico, uma célula de carga e um terminal de entrada (alimentação) e saída (medida de tensão) da célula de carga. As extremidades da

amostra eram envoltas em pequenos pedaços de lixa, posicionadas no aparato de fixação do material biológico, formado por dois blocos móveis e fixadas com parafusos em cada bloco para evitar o deslizamento da pele durante o deslocamento. Antes do início da tração até a ruptura, era aplicado um protocolo de pré-condicionamento do material, que consistia em 10 ciclos de afastamento e aproximação de 30 μm entre os blocos, seguido por um período de relaxamento de 15 segundos, de acordo com o recomendado para esse tipo de análise (KO et al., 2005).

FIGURA 11 – AMOSTRA DE PELE PASSANDO POR TESTE DE TRAÇÃO ATÉ A RUPTURA



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Os blocos pretos se afastam um do outro 30 μm por vez, de acordo com a rotação do eixo acoplado ao motor de passo à direita, e a tensão era mensurada por meio de um transdutor (à esquerda) até o momento da ruptura tecidual.

Durante a tração, os blocos se deslocavam a cada 30 μm e os dados de tensão eram passados para um computador em milivolts, por meio de um transdutor localizado na extremidade de um dos blocos. A coleta era interrompida quando a pele apresentava ruptura tecidual. Os dados obtidos foram transformados de milivolts em newtons por meio de uma equação gerada pela calibração do aparelho, que forneceu o componente linear (em milivolts) em função do componente angular (força em newton). A partir das curvas de tensão obtidas por cada grupo, foi calculado o módulo de Young (Pascal), que calcula o grau de rigidez (*stiffness*) de um material quando submetido à uma tração externa, dado pela razão entre a tensão aplicada e a deformação ou distensão do material – primeira derivada (JUNG; FISHER; WOO, 2009).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

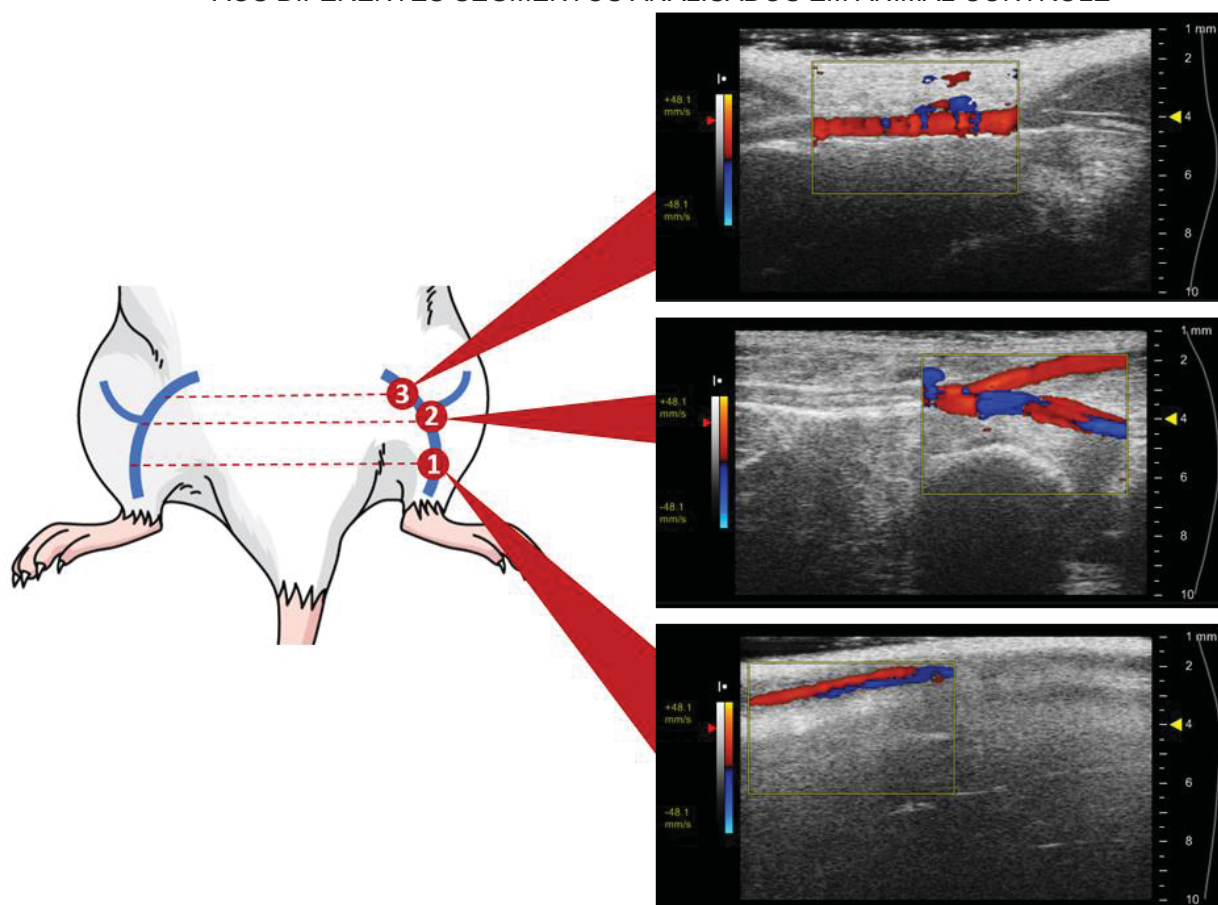
Os dados coletados foram analisados nos aplicativos *Graphpad Prism* e *SPSS* (*Statistical Package for the Social Sciences*) da seguinte maneira. Microcirculação cutânea por LDF e razão de cicatrização da área da ferida foram feitas análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas com teste *post hoc* de Bonferroni e Tukey, respectivamente. A atividade de metaloproteinase-2 foi avaliada por ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey. E os dados de quantificação de colágeno e do teste de ruptura foram avaliados por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 FLUXO DOS VASOS DE MEMBRO INFERIOR

Foi realizado exame de ecodoppler em 14 animais, dos quais 7 passaram por cirurgia de oclusão de veia femoral e 7 não passaram por cirurgia e serviram de controle. A avaliação de fluxo dos vasos dos membros inferiores foi feita bilateralmente e, como demonstrado na figura 12, foram captadas imagens em três locais diferentes do membro inferior, com avaliação de fluxo de veias e artérias safena (porção distal e proximal), epigástrica superficial e femoral.

FIGURA 12 – IMAGENS DE ULTRASSONOGRAFIA COM ECODOPPLER CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES SEGMENTOS ANALISADOS EM ANIMAL CONTROLE

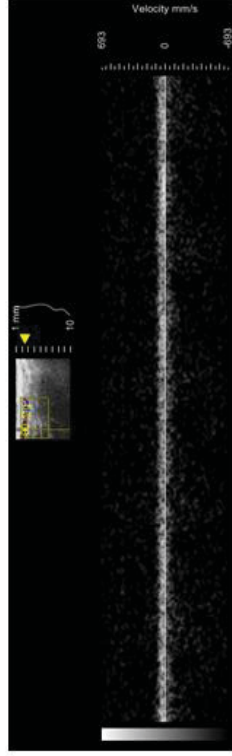


FONTE: O autor (2018).

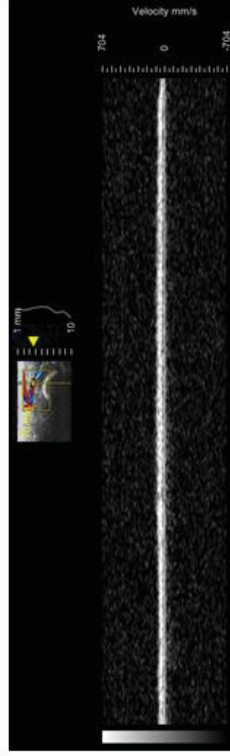
LEGENDA: Na imagem 1, está destacado o fluxo da porção distal da veia e artéria safena. Na imagem 2, podemos observar o fluxo da porção proximal da veia e artéria safena (segmento em vermelho e azul, inferior) e da veia epigástrica superficial (segmento vermelho, superior). Na imagem 3, podemos observar o fluxo da veia femoral.

FIGURA 13 – IMAGENS DE ECODOPPLER DOS VASOS DE MEMBROS INFERIORES EM RATO CONTROLE

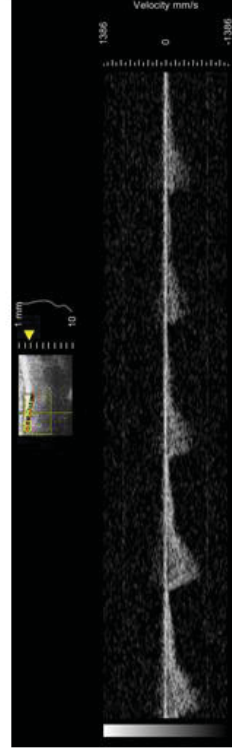
Veia



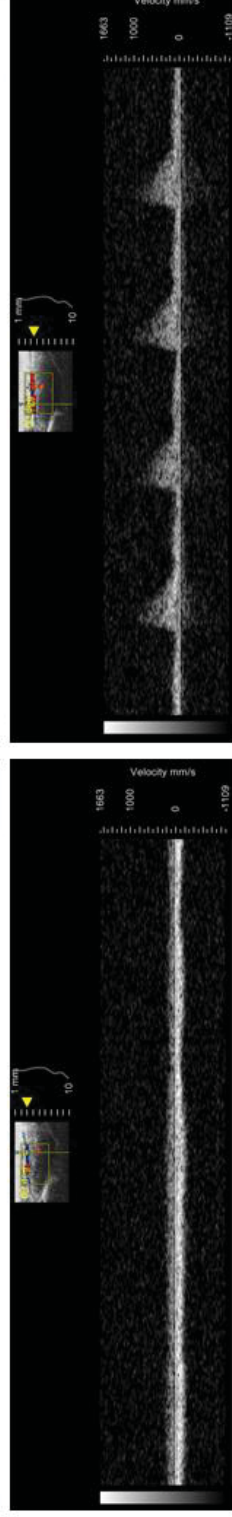
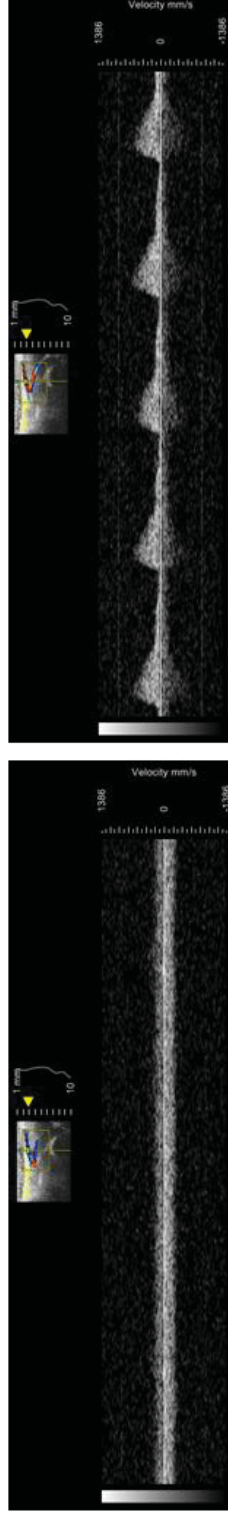
Safena Distal



Safena Proximal



Epigástrica

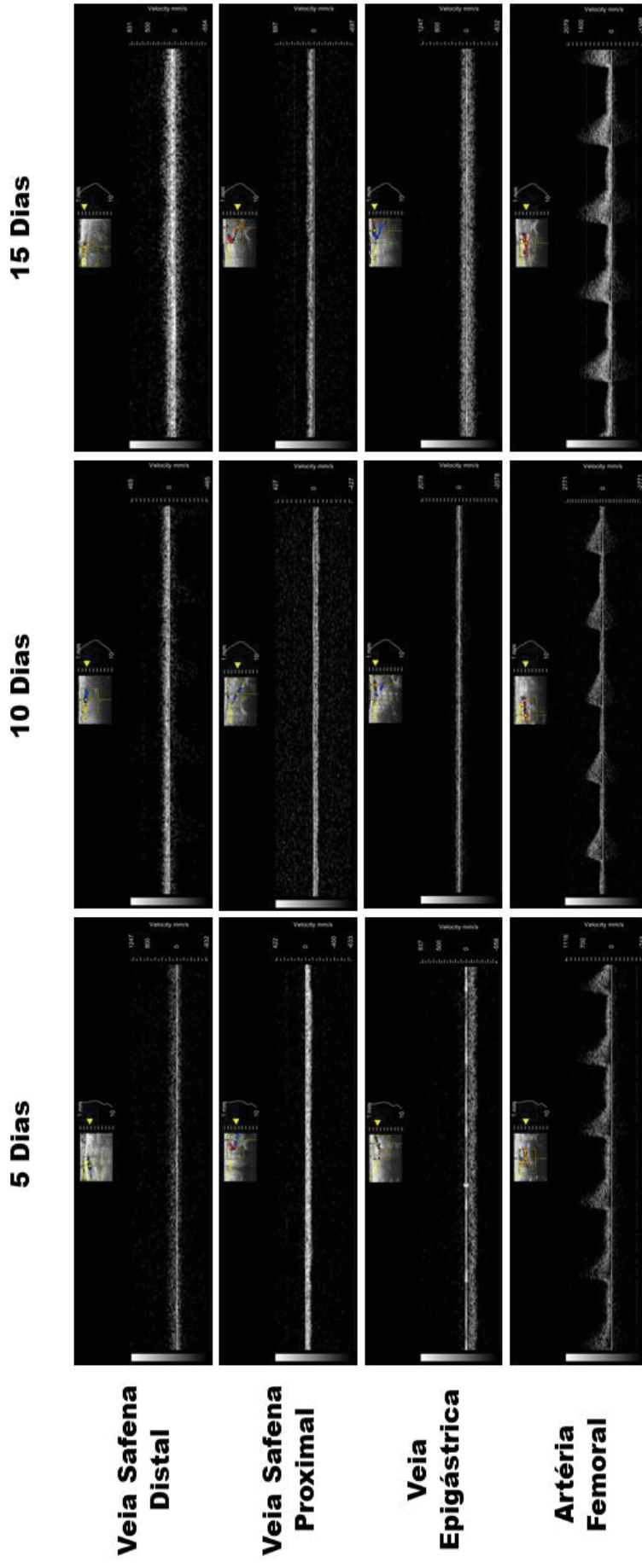


Femoral

Artéria

FONTE: O autor (2018).
 LEGENDA: À esquerda, estão imagens de fluxo venoso e, à direita, fluxo arterial. De cima para baixo, respectivamente estão representados os fluxos da porção distal da safena, da porção proximal da safena, da epigástrica superficial e dos vasos femorais.

FIGURA 14 – IMAGENS DE ECODOPPLER DE ANIMAL QUE PASSOU POR OCLUSÃO DE VEIA FEMORAL (OVF) 5, 10 E 15 DIAS APÓS A CIRURGIA



FONTE: O autor (2018).

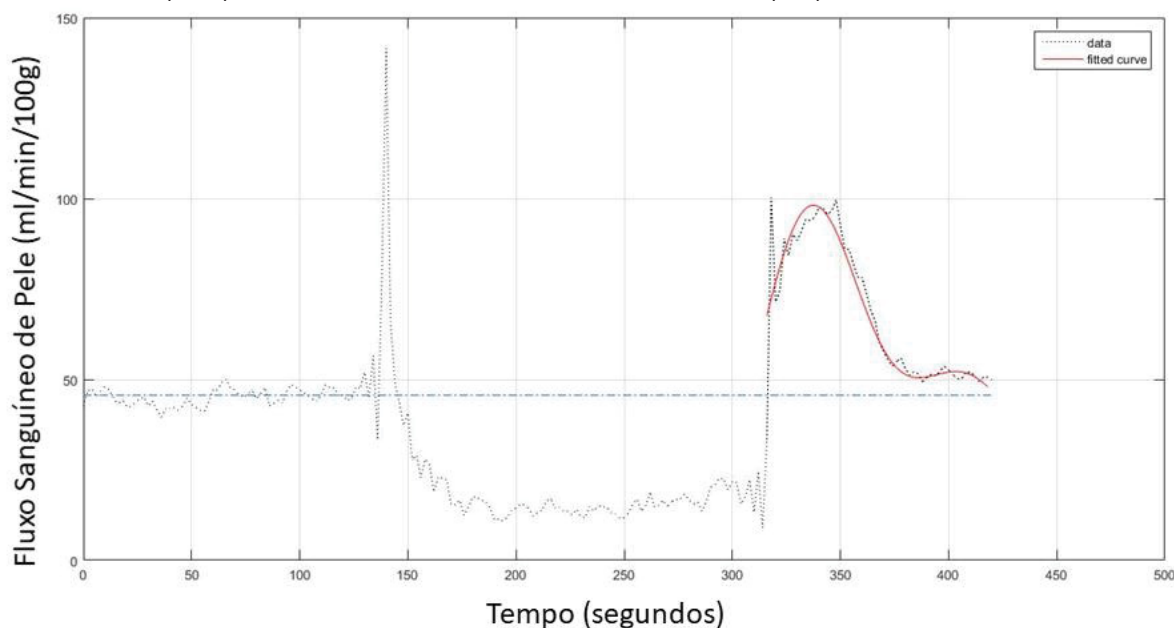
LEGENDA: Notamos fluxo venoso até a altura da cirurgia (abaixo da veia femoral). Não foi encontrado fluxo de veia femoral, porém foi encontrado fluxo de artéria femoral, demonstrando que a cirurgia de OVF obstruiu apenas fluxo venoso.

Em relação às imagens de ecodoppler, na figura 13 observamos imagens de fluxo venoso e arterial de diferentes vasos de membro inferior de animal do grupo controle. Na figura 14, que contem imagens de um animal que passou por cirurgia de OVF, observamos fluxo venoso de veia safena distal e proximal e fluxo venoso da veia epigástrica superficial, porém não foi observado fluxo de veia femoral, onde foi feita a oclusão, até o 15º dia após a cirurgia de OVF. No entanto, foi observado fluxo na artéria femoral do animal, demonstrando que o procedimento foi eficaz na oclusão de fluxo venoso femoral, e permitiu o fluxo arterial do mesmo vaso em questão.

4.2 MICROCIRCULAÇÃO DA PELE DE MEMBRO INFERIOR

A microcirculação da pele pode ser definida como o fluxo sanguíneo dentro de arteríolas, capilares e vênulas com menos de 300 μm de diâmetro (WOLLINA; ABDEL-NASER; MANI, 2006). Nesse estudo, a circulação foi analisada por meio de fluxometria por laser doppler (LDF) com ensaios de hiperemia reativa (HR, figura 15) e hiperemia por aquecimento (HA, figura 16) de 14 animais, sendo 7 do grupo controle (grupo C) e 7 que passaram por cirurgia de OVF (grupo V).

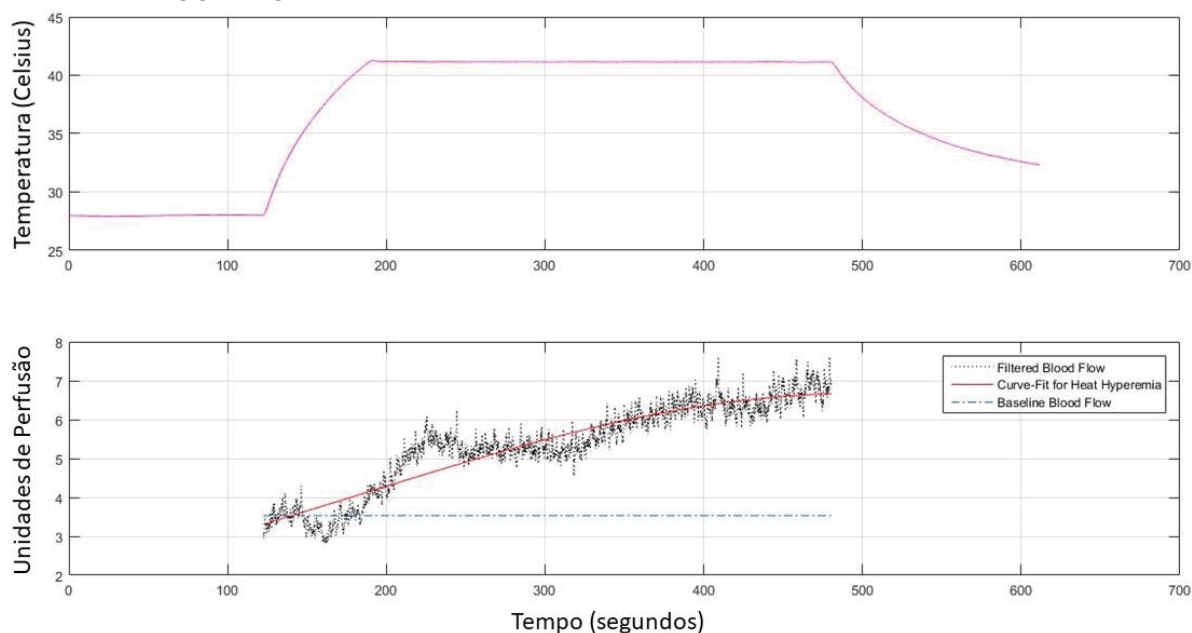
FIGURA 15 – ANÁLISE DE FLUXO DE MICROCIRCULAÇÃO DE PELE POR LASER DOPPLER (LDF) POR ESTÍMULO DE HIPEREMIA REATIVA (HR) EM ANIMAL CONTROLE



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: O primeiro pico observado representa o momento que a pressão começa a ser exercida na região analisada, seguido de diminuição de fluxo sanguíneo local. O segundo pico representa o momento que a pressão é liberada, seguido de um aumento abrupto do fluxo da microcirculação, que tende a voltar a valores próximos dos basais após alguns instantes.

FIGURA 16 – ANÁLISE DE FLUXO DE MICROCIRCULAÇÃO DE PELE POR LASER DOPPLER (LDF) POR ESTÍMULO DE HIPEREMIA POR AQUECIMENTO (HA) EM ANIMAL CONTROLE

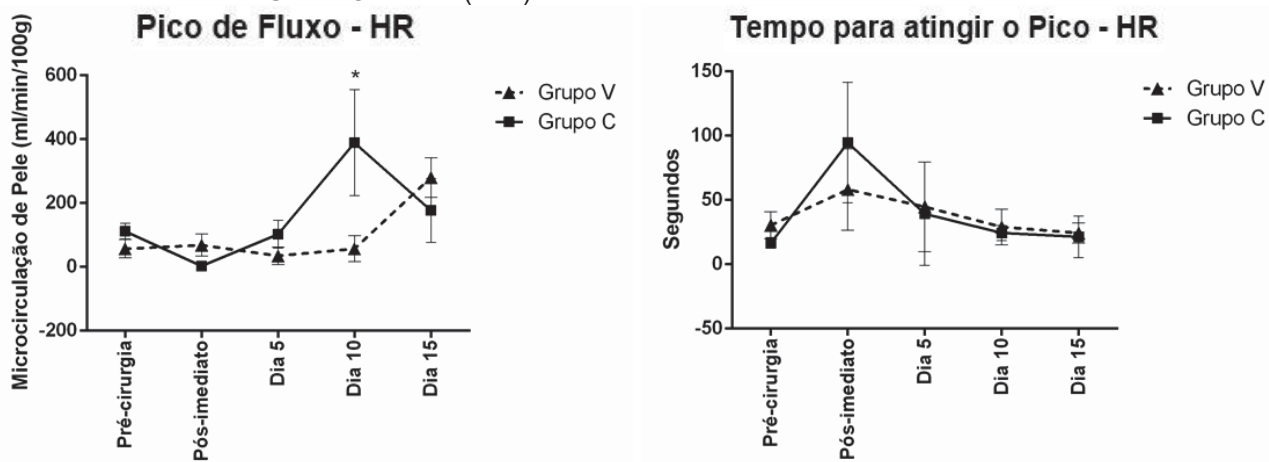


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Acima, observamos o valor de temperatura em Celsius dado pela ponta do transdutor, que atinge 41°C e permanece por 5 minutos. Abaixo, observamos o comportamento da perfusão ao longo desse aquecimento, aumentando em função do tempo de aquecimento da região analisada.

Na análise da HR (figura 17), a média de pico de fluxo normalizado foi mais alta no grupo controle do que no grupo com OVF no décimo dia após a cirurgia ($p=0,03$; $f=3,3$). Não houve diferença estatística quanto ao tempo médio para atingir o pico de fluxo entre os dois grupos ($p=0,3$; $f=1,3$).

FIGURA 17 – DADOS DE HIPEREMIA REATIVA (HR) OBTIDOS PELA FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)

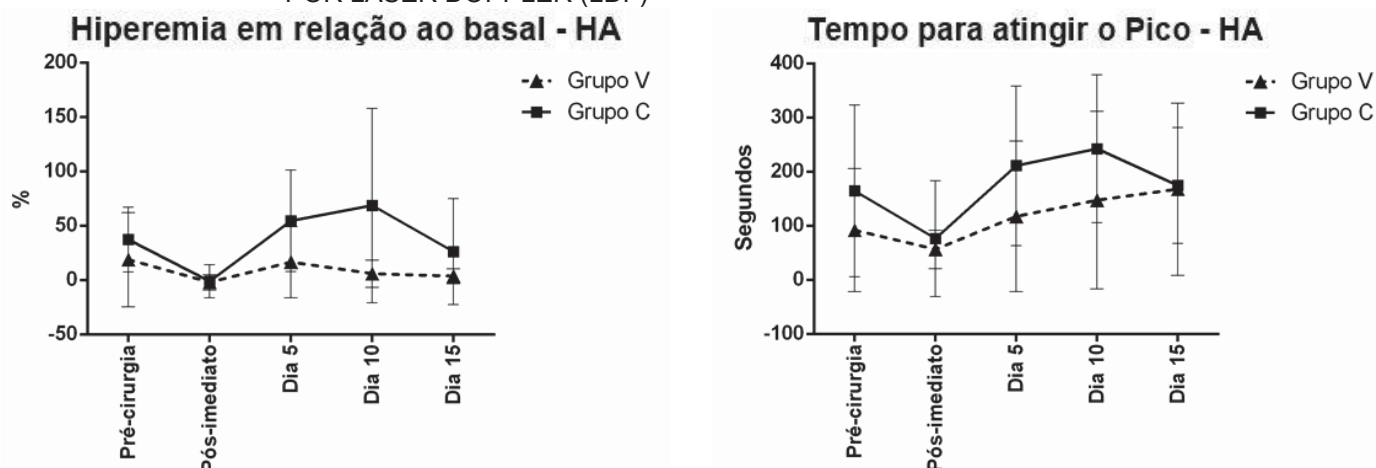


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Grupo C: controle; Grupo V: animais com oclusão de veia femoral.

Na análise da HA (figura 18), não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos quanto à porcentagem de hiperemia causada pelo calor em relação aos valores basais ($p=0,5$; $f=0,8$), como também no tempo para atingir o pico de fluxo ($p=0,9$; $f=0,2$), apesar de uma tendência do grupo com OVF apresentar valores numéricos mais baixos.

FIGURA 18 – DADOS DE HIPEREMIA POR AQUECIMENTO (HA) OBTIDOS PELA FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER (LDF)



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Grupo C: controle; Grupo V: animais com oclusão de veia femoral.

4.3 ÁREA DA ÚLCERA

Foram analisadas áreas de ferimentos em 52 animais. Na tabela 3, estão representadas as médias e desvios padrão das áreas em centímetro quadrados. Não houve diferença estatística entre os grupos em um mesmo dia.

TABELA 3 – ÁREA DA ÚLCERA EM CENTÍMETROS QUADRADOS

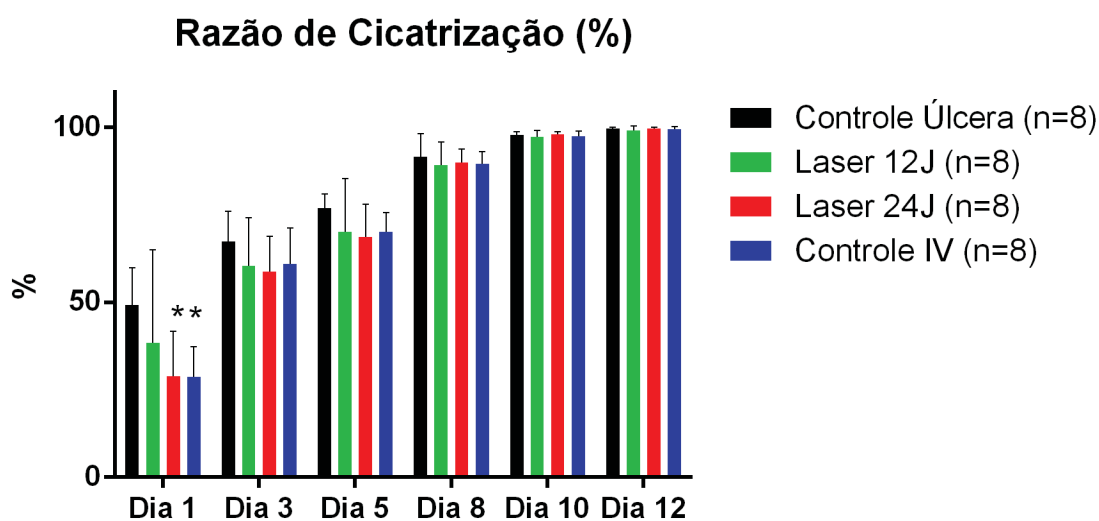
Grupo	Área da úlcera (cm ²)						
	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 8	Dia 10	Dia 12
IV (n=12)	2,73±0,2	1,90±0,3	0,99±0,2	0,77±0,1	0,26±0,09	0,06±0,04	0,01±0,02
L12 (n=12)	2,88±0,6	1,78±0,5	1,10±0,38	0,82±0,3	0,29±0,1	0,08±0,04	0,02±0,03
L24 (n=12)	2,73±0,3	1,90±0,2	1,11±0,2	0,84±0,2	0,26±0,1	0,06±0,02	0,01±0,1
CL12 (n=8)	2,90±0,1	1,90±0,4	0,96±0,2	0,88±0,1	0,36±0,07	0,09±0,03	0,02±0,4
C (n=8)	3,06±0,7	1,52±0,3	0,98±0,2	0,71±0,2	0,25±0,2	0,06±0,03	0,01±0,01

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Os dados estão representados em média±desvio padrão. IV, insuficiência venosa; L12, laser 12J; L24, laser 24J; CL12, controle laser 12J; C, controle. J=joules.

Quando corrigidos para porcentagem (razão de cicatrização), foi observado diferença dos grupos IVC e L24 com o grupo controle úlcera (sem cirurgia de OVF) no primeiro dia após a indução do ferimento ($p < 0,001$; $f = 3,9$; figura 19). Como observado, a aplicação do Laser de baixa potência não alterou a razão de cicatrização de úlceras nos pontos avaliados ao longo do tratamento.

FIGURA 19 – RAZÃO DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS NOS DIFERENTES GRUPOS ANALISADO NOS DIAS 1, 3, 5, 8, 10 E 12 APÓS A INDUÇÃO DO FERIMENTO

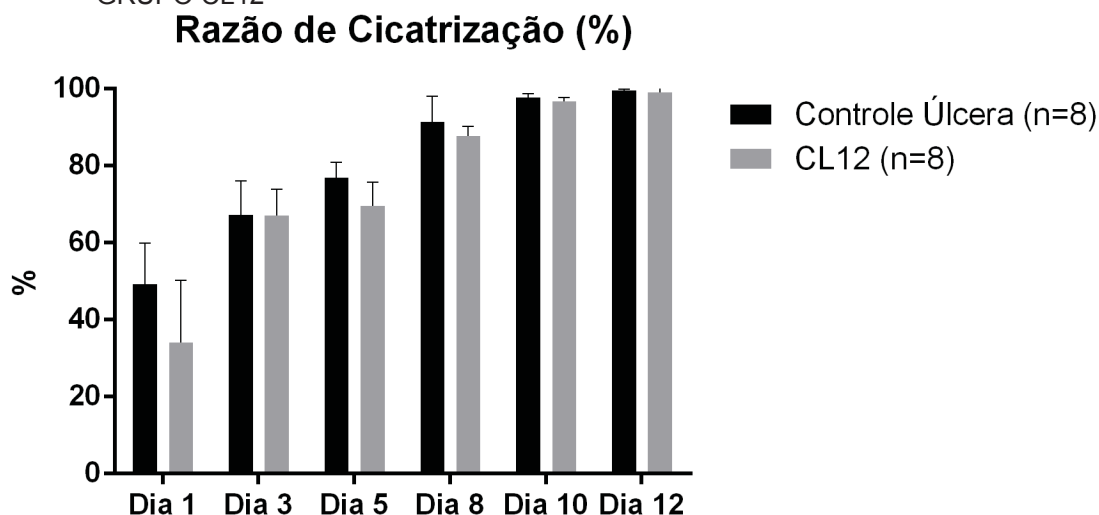


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: *diferença em relação ao grupo controle úlcera ($p < 0,001$). J: joule.

Na figura 20, observamos a comparação entre o grupo controle e o grupo CL12 demonstrando que não houve diferença estatística entre eles.

FIGURA 20 – RAZÃO DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS ENTRE O GRUPO CONTROLE E O GRUPO CL12

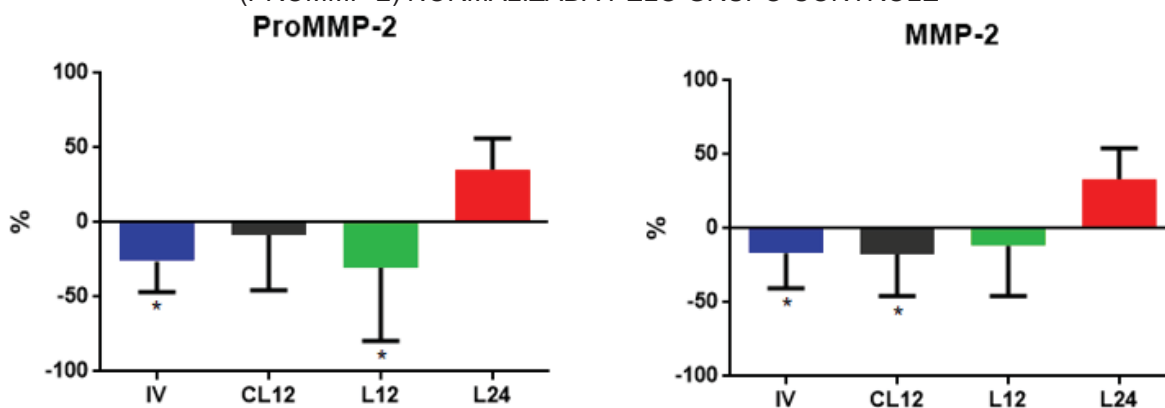


FONTE: O autor (2018).

4.4 ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE 2 DA PELE

Os resultados de atividade de MMP-2 foram obtidos a partir de amostras de pele da região posterior da coxa de 21 animais dos grupos IV (n=5), CL12 (n=5), L12 (n=5) e L24 (n=6), que foram normalizados a partir de um *pool* de amostras de 9 animais do grupo controle. Os resultados demonstraram que os animais do grupo L24 apresentaram um aumento significativo da expressão de MMP-2 quando comparado aos grupos IV e CL12 ($p=0,01$; $f=4,7$) e aumento da expressão da pró-enzima (proMMP-2) comparado aos grupos IV e L12 ($p=0,01$; $f=4,5$; figura 21). Os dados com média e desvio-padrão estão no Apêndice A.

FIGURA 21 – ATIVIDADES DE METALOPROTEINASE-2 (MMP-2) E DE SUA PRÓ-ENZIMA (PROMMP-2) NORMALIZADA PELO GRUPO CONTROLE



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: *diferença significativa em comparação ao grupo L24 ($p=0,01$). IV: controle insuficiência venosa; CL12: controle laser; L12: laser 12 joules; L24: laser 24 joules.

4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE COLÁGENO POR HISTOLOGIA

Foram captadas imagens de lâminas de pele de 25 ratos em microscópio de luz não-polarizada e polarizada (figura 22). A proporção de colágeno tipo I e tipo III não apresentou diferença entre os grupos (tabela 4), bem como a análise da distribuição das fibras de colágeno por cor (figura 23).

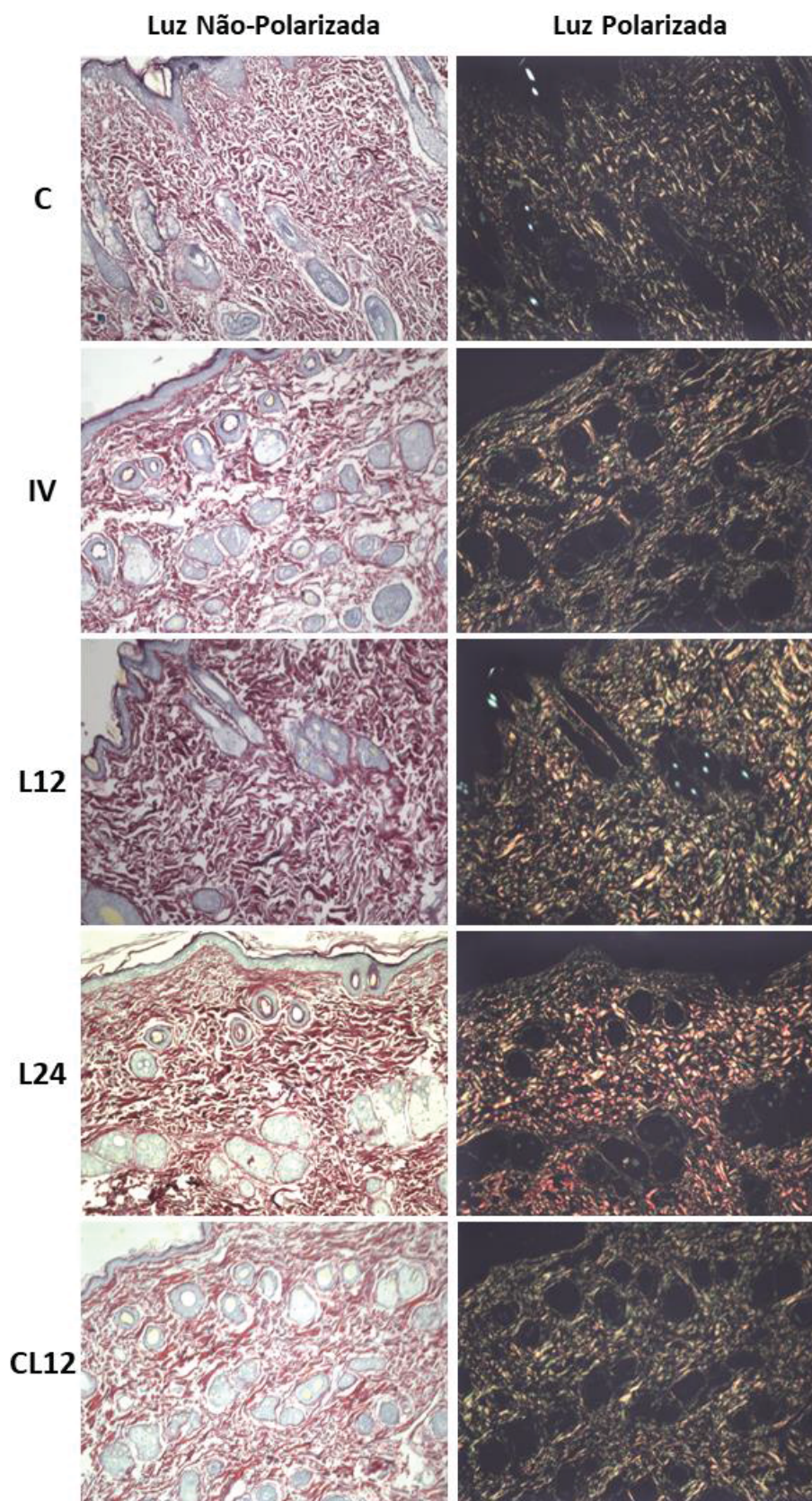
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III NA DERME EM RELAÇÃO AO COLÁGENO TOTAL

	C (n=5)	IV (n=4)	L12 (n=5)	L24 (n=5)	CL12 (n=6)	p
Colágeno tipo I	88,8%±0,7	86,9%±2,6	80,6%±5,4	84,4%±6,8	82,0%±4,9	0,56
Colágeno tipo III	11,2%±0,7	13,1%±2,6	19,4%±5,4	15,6%±6,8	18,0%±4,9	0,56

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Os dados estão em média±erro padrão da média. C: controle; IV: insuficiência venosa; L12: laser 12 joules; L24: laser 24 joules; CL12: controle laser 12 joules.

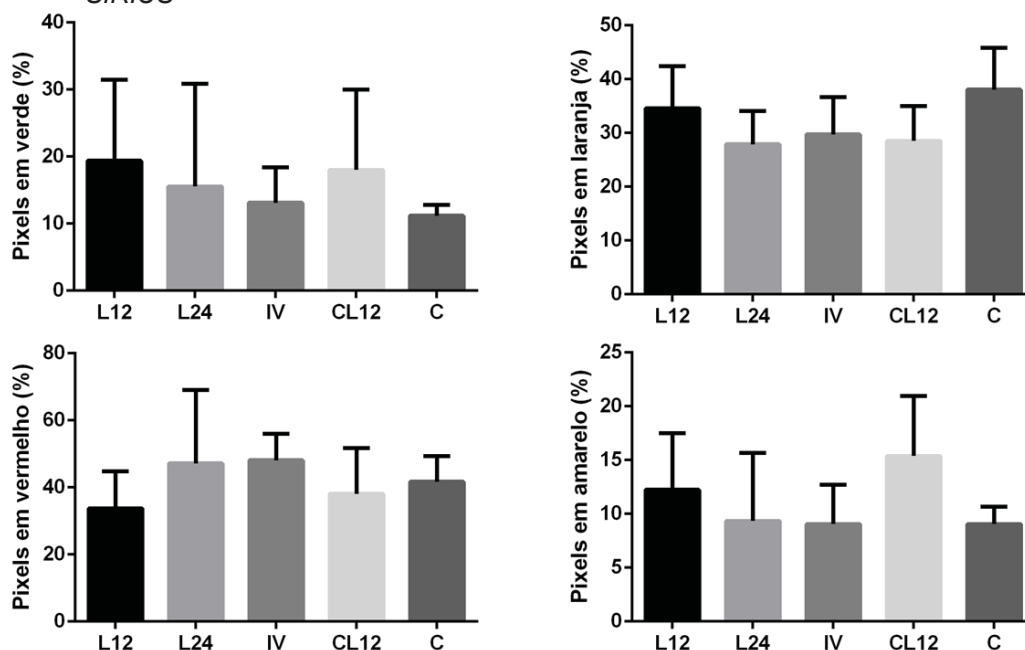
FIGURA 22 – LÂMINAS DE PELE CICATRIZADA DE RATOS CORADAS COM *PICRO SIRIUS RED* COM AUMENTO DE 10X



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Imagens digitalizadas com microscópio de luz não-polarizada à esquerda e imagens com luz polarizada à direita. C: controle; IV: insuficiência venosa; L12: laser 12 joules; L24: laser 24 joules; CL12: controle laser 12 joules.

FIGURA 23 – DISTRIBUIÇÃO DE COLÁGENO POR CORES DE LÂMINAS CORADAS COM *PICRO SIRIUS*



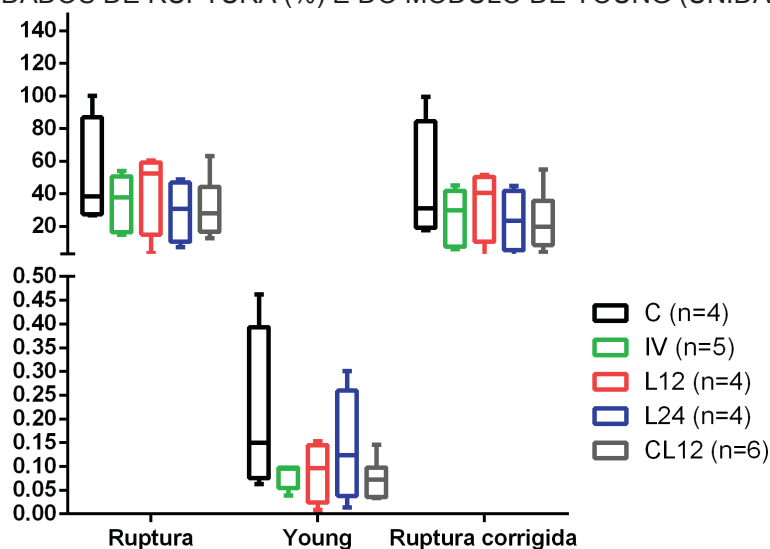
FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: L12: laser 12 joules (n=5); L24: laser 24 joules (n=5); IV: insuficiência venosa (n=4); CL12: controle laser 12 joules (n=6); C: controle (n=5).

4.6 TESTE DE RUPTURA DA PELE

Os dados biomecânicos da pele foram obtidos a partir de amostras de 23 ratos dos 5 grupos estudados na segunda etapa do estudo. O módulo de Young foi calculado para determinar a rigidez do material a partir da porção linear da curva de tensão-distensão. Os valores não diferiram entre os grupos (figura 24).

FIGURA 24 – DADOS DE RUPTURA (%) E DO MÓDULO DE YOUNG (UNIDADE ABSOLUTA)



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: C: controle; IV: insuficiência venosa; L12: laser 12 joules; L24: laser 24 joules; CL12: controle laser 12 joules.

5 DISCUSSÃO

5.1 O MODELO DE CIRURGIA DE OCLUSÃO DA VEIA FEMORAL E SUAS REPERCUSSÕES CIRCULATÓRIAS

Existem modelos animais bem estabelecidos para o desenvolvimento de doenças vasculares, principalmente modelos de insuficiência arterial (PIPINOS et al., 2008). No que concerne à insuficiência venosa, há uma variedade de modelos com técnicas de fístula arteriovenosa, que leva à diminuição e desaparecimento dos folhetos das válvulas venosas, porém gera uma mortalidade animal considerável por insuficiência cardíaca (PASCARELLA; SCHMID-SCHÖNBEIN; BERGAN, 2005; VAN BEMMELEN et al., 1986); lesão por oclusão e reperfusão, que permite o estudo da adesão e diapedese leucocitária, no entanto sem a manutenção de uma hipertensão venosa constante, o que seria característico da IVC (NUNAN; HARDING; MARTIN, 2014); e obstrução por ligadura com fio de sutura em diferentes veias bilateralmente e na veia cava inferior, o que exige um procedimento cirúrgico mais invasivo e complexo (LALKA; UNTHANK; NIXON, 1998).

No presente estudo, foi proposto um modelo de obstrução de veia femoral unilateral por ligação com fio de seda, no nível acima da veia epigástrica superficial, e a investigação das repercussões hemodinâmicas e microcirculatórias desse procedimento cirúrgico. A análise qualitativa, feita através de ultrassonografia com ecodoppler, da presença/ausência de fluxo demonstrou que a oclusão feita por ligadura com fio de seda impediu o retorno venoso por meio da veia femoral durante todo o período de avaliação, ou seja, até o décimo quinto dia de pós-cirúrgico. Isso evidencia que a cirurgia de oclusão proposta foi eficaz no bloqueio do retorno venoso pela veia femoral. Apesar do ecodoppler fornecer dados de velocidade do fluxo sanguíneo e o aparelho utilizado ser específico para estudo em animais de pequeno porte, esses valores não foram calculados para comparação nesse estudo, pois essa variável de velocidade de fluxo era fortemente influenciada por fatores externos ao procedimento cirúrgico, como o posicionamento do transdutor do ultrassom e a pressão exercida sobre a área do exame, impedindo uma reprodutibilidade fidedigna que permitisse a comparação entre os diferentes grupos.

Um quadro de obstrução venosa, como a gerada pelo procedimento cirúrgico desse estudo, gera hipertensão venosa, que por sua vez, quando sustentada por

vários dias, está associada à inflamação dos vasos da microcirculação, remodelamento dos vasos e apoptose (ALSAIGH et al., 2011; POCOOCK et al., 2014). Essas mudanças patológicas da microcirculação aumentam em função da severidade clínica da IVC e incluem diminuição do número e mudança da morfologia de capilares, aumento da permeabilidade dos capilares para substâncias de baixo peso molecular e diminuição do volume de reserva vascular (JUNGER et al., 2000).

Diante disso, também nos propusemos a investigar a microcirculação de pele no membro onde foi realizada a oclusão por meio da fluxometria por laser doppler (LDF), e observamos na análise de hiperemia reativa por pressão (HR), que houve diferença significativa no pico de fluxo de microcirculação apenas no décimo dia após a cirurgia entre o grupo controle e o grupo com OVF e não houve diferença entre os grupos no tempo necessário para atingir o pico de fluxo. Pode-se inferir que a diminuição do pico de fluxo possa ser devido ao déficit de retorno venoso, que, conseqüentemente, interfere no aporte sanguíneo da pele ao dificultar a microcirculação. Na análise da hiperemia por aquecimento (HA), observamos uma tendência do grupo com OVF apresentar uma porcentagem de resposta vascular mais baixa que o grupo controle em relação ao fluxo basal e uma tendência de atingir o pico de fluxo mais rapidamente que o grupo controle no 5º e 10º dias após a cirurgia, porém sem diferença estatística. Essa tendência do grupo com OVF apresentar um menor tempo para atingir o pico de fluxo pode ser devido aos valores do pico serem mais baixos nesse grupo do que no controle, tendo em vista que os dias de pico de fluxo mais alto do grupo controle (5º e 10º dia) coincidem com maior tempo para atingir esse pico. Uma análise com mais animais e com intervalo menor entre os dias de avaliação poderiam aumentar o poder estatístico e esclarecer esta possível lentidão no aumento do fluxo pós hiperemia.

O sinal de microcirculação captado pelo transdutor de LDF é influenciado pela atividade do sistema nervoso autônomo, pelo ciclo cardíaco, respiração e metabolismo local (LAL; UNNI, 2015) e a análise feita no presente estudo não permite diferenciar a influência isolada de cada mecanismo de controle. No entanto, a técnica é capaz de observar diferenças na microcirculação de ratos que passaram por procedimento de oclusão vascular comparado a ratos controle, porém não fornece dados específicos quanto ao tipo de oclusão, se arterial ou venosa (GALLA; HELLEKES; FELLER, 1999). Em nosso estudo, a avaliação do pós-cirúrgico era realizada no mesmo dia da cirurgia, aproximadamente 3 horas após a oclusão, isso

exigia duas sedações com isoflurano no mesmo dia, além da necessidade de anestesia nos demais dias na avaliação de fluxo com a LDF. Como a anestesia leva a uma supressão momentânea da função cardiovascular e da função metabólica, a análise do fluxo nessas condições se apresenta como uma limitação por se tornar um viés em nossa análise.

A relevância do modelo animal proposto nessa pesquisa reside no fato de unir a condição de IVC, provocada por cirurgia de oclusão de veia femoral, à indução de uma úlcera na região posterior ipsilateral ao procedimento cirúrgico, buscando mimetizar a situação clínica de úlcera venosa em pacientes com IVC. Além disso, a mortalidade animal no período pós-cirúrgico foi igual a 0, evidenciando que esse é um modelo seguro e viável de análise.

Na segunda etapa do estudo, também buscamos investigar o laser de baixa intensidade como ferramenta de tratamento na aceleração da cicatrização desses ferimentos, como será discutido posteriormente. Os resultados do presente estudo demonstraram que a técnica utilizada é capaz de causar oclusão permanente da veia femoral (durante o período avaliado) e a consequente disfunção vascular está associada a diminuição do pico de fluxo na microcirculação ao redor do décimo dia.

5.2 ESTUDO DE ÁREA NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Os resultados desse estudo não forneceram evidências de que o laser de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados neste estudo, seja uma terapia capaz de acelerar a cicatrização de ferimentos em ratos com oclusão da veia femoral, simulando uma úlcera venosa, pois não houveram diferenças significativas de área de ferimentos nos diferentes grupos em decorrência da irradiação. Estatisticamente, observamos diferença do grupo IVC e L24 com o controle nas primeiras 24 horas após a indução do ferimento, do dia 0 para o dia 1, porém não houve aplicação de laser nesse intervalo, bem como nenhuma manipulação foi realizada no ferimento, com exceção da foto logo após a indução da úlcera ainda com o animal anestesiado. Portanto, as diferenças encontradas entre grupos nesse período podem ser explicadas pela pequena variação do tamanho inicial das úlceras devido ao corte da região com

tesoura e pela consequência da disfunção venosa e alteração microcirculatória nestes grupos. Posteriormente, testamos a utilização do laser, nos mesmos parâmetros utilizados em ratos com a disfunção venosa, em ferimentos de animais sem oclusão venosa (grupo CL12) e também não encontramos evidência de efeito cicatricial.

A úlcera foi induzida com uma tesoura cirúrgica cortando a pele de acordo com a marcação e a média de tamanho inicial ficou entre 2,7 e 3,0 cm², sendo esse um tamanho consideravelmente maior do que em outros estudos que investigaram cicatrização de ferimento em ratos, normalmente feito entre 6 milímetros de diâmetro e 2 cm² de área (ALTOMARE et al., 2009; DANNO et al., 2001; DORSETT-MARTIN, 2004; SILVA et al., 2013a; TUK et al., 2014). Esse tamanho inicial maior pode garantir uma diferenciação mais explícita entre o processo de contração e o de reepitelização, etapas comuns e concomitantes à cicatrização de ferimentos cutâneos. A diminuição nas primeiras 24 horas, mesmo sem a aplicação de nenhum recurso terapêutico, pode ser atribuída à contração tecidual, que é bem mais proeminente no rato do que no ser humano (DAVIDSON; YU; OPALENIK, 2013). No entanto, há relatos de que a contração da ferida em roedores só ocorre após a re-epitelização, portanto, a contração *per se* não invalida a utilização desse modelo na cicatrização de ferimentos (CHEN et al., 2015). Além disso, a contração em feridas circulares, modelo utilizado nesse estudo, é menos proeminente do que em feridas retangulares (DORSETT-MARTIN, 2004), sendo então o formato circular uma maneira de atenuar a contração da pele durante a cicatrização.

Outro fator relevante na investigação do comportamento cicatricial desses ferimentos em ratos é a localização da lesão, que também diferiu de maioria dos demais trabalhos disponíveis na literatura, os quais induzem o ferimento no dorso do animal (DORSETT-MARTIN, 2004; KORELO et al., 2016; NUNAN; HARDING; MARTIN, 2014; SILVA et al., 2013a; TUK et al., 2014). No nosso estudo, o ferimento foi induzido na porção posterior da pata inferior esquerda, onde o epitélio se demonstra mais delgado do que no dorso do animal. Além disso, a intenção era simular uma úlcera venosa de membro inferior e neste local era possível realizar uma ferida com as dimensões pretendidas e que possibilitasse com facilidade a realização de planimetria e aplicação de irradiação laser. Isso pode explicar parcialmente o fato de, mesmo com um tamanho inicial de ferida de aproximadamente 3 cm², os ferimentos dos animais de todos os grupos, independentes da condição circulatória e

do tratamento aplicado, chegarem a quase 100% de cicatrização no décimo segundo dia após a sua indução.

Os métodos de mensuração de feridas com fotografia são discutidos na literatura sobre os possíveis vieses quanto à iluminação, distância da lente da câmera em relação ao ferimento e a determinação manual da área (DEANA et al., 2013; PAPAZOGLU et al., 2010). Nesse estudo, a obtenção das imagens de úlcera foi feita com câmera fotográfica digital em condições constantes de iluminação com luzes de led acopladas ao suporte da câmera. Os animais foram fotografados com anestesia apenas no dia 0, nos demais dias eles eram brevemente imobilizados por um investigador enquanto outro manipulava a câmera para a foto. A câmera foi fixada sempre na mesma posição e altura, além disso, uma mesma escala métrica era posicionada ao lado do ferimento, no mesmo nível, para calibração logo antes da análise de cada imagem, para evitar variações de mensuração devido à distância entre o ferimento e a lente, principalmente nos momentos em que o animal se encontrava imobilizado sem anestesia. Portanto, a análise de área por meio de fotografias se demonstra um método reprodutível diante da possibilidade de controle dessas variáveis.

A definição da dose de laser utilizada para o tratamento de feridas provavelmente está relacionada à ausência de evidência de que esse recurso seja eficaz na aceleração da cicatrização, pois não há consenso quanto a um intervalo terapêutico específico de parâmetros, como será discutido a seguir ao final do próximo tópico.

5.3 O PAPEL DA METALOPROTEINASE 2 NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Nesse estudo, a análise da atividade de MMP-2 no tecido cicatricial foi feita em comparativo com um *pool* de amostras do grupo controle e observamos que o grupo L24 apresentou maior atividade total de MMP-2 comparado aos demais grupos. Alguns estudos reportaram níveis aumentados de MMP-2 tecidual na IVC (POCOCK et al., 2014), entretanto o papel específico da MMP-2 na cicatrização de feridas ainda não está bem claro (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013), mas vem sendo observado

que essa enzima participa de um processo de transição da matriz extracelular, de uma situação de remodelamento para degradação (MURPHY; NAGASE, 2008) e é sintetizada por queratinócitos e fibroblastos (SAWICKI et al., 2005). Um estudo *in vitro* demonstrou que após a aplicação de um composto de pó de pérola, usado como agente cicatricial, inibiu a atividade de MMP-2 ao passo que estimulou a síntese de seu inibidor, a TIMP-1 (JIAN-PING et al., 2010), sugerindo que a MMP-2 pode desempenhar um papel no retardo da cicatrização de úlceras crônicas.

Em um estudo investigando ferimentos com ratos diabéticos, foi observado uma maior expressão gênica de MMP-2 nas úlceras de ratos diabéticos comparado com o grupo controle, bem como uma diminuição dessa expressão de MMP-2 quando os ratos eram tratados com laser de baixa intensidade (dosimetria: 660nm, 50mW, 4J/cm², 80s) comparado com os ratos diabéticos não-tratados (SILVA et al., 2013b). Em contrapartida, em estudo com células humanas, com irradiação infravermelha em doses significativamente mais altas (de 36 a 108J/cm², por 20 a 60min), foi reportado aumento da expressão e da atividade de MMP-2 (DANNO et al., 2001).

De acordo com os resultados encontrados no nosso estudo, a ideia de que a dose do laser pode determinar o perfil de atividade enzimática é reforçada, além de caráter não-linear da interação da radiação com os tecidos biológicos, onde a ação benéfica do laser parece ser maior em comprimentos de onda intermediários e delétrios nos extremos (SUZUKI; TAKAKUDA, 2016). A relevância desse dado se dá diante de uma problemática fundamental que acompanha os estudos com laser: a dosimetria. O comprimento de onda que apresenta efeitos de fotobiomodulação fica entre 600 e 860 nm, com 4 intervalos com picos de absorção de luz pela citocromo c oxidase (613,5-625,5nm; 667,7-683,7nm; 750,7-772,3nm e 812,5-846,0nm) (KARU; KOLYAKOV, 2005). Contudo, a determinação dos demais parâmetros da dose ainda é um ponto de grande discussão, pois não há uma determinação muito clara de um intervalo terapêutico específico, com potências variando de 2 a 500mW e densidade de energia de 1 a 60J/cm² em estudos com aplicação sobre ferimentos cutâneos em ratos (DE LIMA et al., 2016; DO NASCIMENTO et al., 2004). Além dessas variações de dose, a própria descrição detalhada dos parâmetros é um ponto crítico nos estudos, pois comumente há ausência de detalhes suficientes para a replicação do método, associado há uma falta de consenso dos fabricantes dos aparelhos na maneira que eles mensuram e apresentam as especificações da radiação (JENKINS; CARROLL, 2011).

Além de uma necessidade de melhores esclarecimentos quanto à dose com efeitos biomoduladores terapêuticos, estudos que tratem a terapia com laser de baixa intensidade como um recurso coadjuvante, e não necessariamente o recurso principal na cicatrização, podem ser uma alternativa capaz de demonstrar uma possível efetividade desse recurso, como a administração associada de fatores de crescimento (PEPLOW; BAXTER, 2012) ou terapia combinada com outros recursos fotoeletroterapêuticos (KORELO et al., 2016).

O presente estudo contribui demonstrando que, além de não haver efeito cicatricial positivo da dose mais alta de laser utilizada, 24J, esta dose induziu maior atividade de MMP-2. A atividade de MMP-2 pode estar aumentada no remodelamento tecidual, porém aumento sustentado da atividade de gelatinases ocorre em úlceras crônicas de difícil cicatrização. O aumento da atividade de MMP-2 induzido pela maior dose do laser poderia contribuir negativamente para a manutenção e a integridade das propriedades teciduais normais.

5.4 O REMODELAMENTO DO TECIDO CONJUNTIVO NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS TRATADAS COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A cicatrização de ferimentos pode ser dividida em 4 etapas, iniciando pela hemostasia, seguida das fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento, com cada fase apresentando diversos eventos celulares e bioquímicos como quimiotaxia, divisão celular, neovascularização e deposição de fibras colágenas, sendo este último evento predominante na fase de remodelamento e de extrema importância para a integridade do tecido regenerado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ENOCH; LEAPER, 2008). Em nosso estudo, foi realizada a quantificação de colágeno na pele cicatrizada no 13º dia após a indução da úlcera dos ratos de todos os grupos investigados na segunda etapa. Essa quantificação se deu quanto ao tipo (colágeno tipo I e tipo III) e quanto à espessura das fibras, que se apresentam com pixels em colorações distintas quando coradas com *Picro Sirius Red* e analisadas sob microscópio de luz polarizada.

Os resultados obtidos não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Isso pode ser explicado devido ao tempo entre a indução da úlcera e a coleta das amostras de pele para serem fixadas, que foi de aproximadamente duas

semanas, ou seja, na fase final de cicatrização para os ratos. No ser humano, a fase proliferativa de cicatrização pode iniciar a partir do terceiro dia e durar de duas a quatro semanas após a lesão inicial (ENOCH; LEAPER, 2008). No rato, essa sequência temporal de cicatrização não é bem determinada, porém provavelmente é mais curta, considerando o intenso metabolismo dos roedores. Portanto, duas semanas pode ter sido um tempo demasiado longo para a investigação de possíveis diferenças entre os grupos e análises precoces poderiam demonstrar efeitos transitórios sobre alterações no remodelamento tecidual. Contudo, ao final das duas semanas, pode-se observar que o uso do laser não alterou a razão de expressão de colágenos na derme.

Em um estudo que analisou lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina, de ferimentos de ratos irradiados com laser de baixa intensidade, as amostras foram coletadas no oitavo dia após a lesão (DO NASCIMENTO et al., 2004). Três potências diferentes (2, 15 e 25 mW) com dois comprimentos de onda (670 e 685 nm) foram testadas, resultando em uma mesma dose final total de 10 J/cm² por sessão, e foi verificado uma relação inversamente proporcional entre o comprimento de onda e a potência com cicatrização, onde o tratamento apresentou resultados positivos quando aplicados com a potência mais alta e comprimento de onda mais baixo, ou com comprimento de onda mais alto e a menor potência. Em outro estudo, onde as amostras de pele de ratos foram coletadas 10 dias após a indução da úlcera (BRASSOLATTI et al., 2016), o LBI foi aplicado com potências de 50 e 100 mW em queimaduras de rato, resultando em doses finais diferentes (12,5 e 25 J/cm²), e como resultado observaram que a dose com 12,5 J/cm² apresentou amostras de pele com menor quantidade de colágeno quando comparadas tanto ao grupo controle quanto ao grupo com dose de 25 J/cm², sendo indicativo de que uma potência mais baixa gerou uma cicatrização mais lenta, inclusive quando comparado a animais que não passaram por nenhum protocolo de irradiação. Um terceiro estudo (GONÇALVES et al., 2013), também com aplicação de LBI em úlceras em ratos (doses de 30 e 90 J/cm²), induziu três ferimentos em cada animal e, a cada 7 dias, um fragmento de pele era coletado para análise histológica, até o 21º dia. Foi reportado predominância de colágeno tipo III em todos os grupos (controle, 30 e 90 J/cm²) no 7º e 14º dia e predominância de colágeno tipo I apenas no grupo com maior dose (90 J/cm²) no 21º dia; e quando observado outras variáveis como densidade vascular, angiogênese e quantidade de fibroblastos, o grupo com maior dose também apresentou um quadro mais favorável à cicatrização, contradizendo estudos que afirmam que uma dose mais

alta possivelmente apresentaria um efeito inibidor na cicatrização (MESTER; MESTER; MESTER, 1985; REDDY, 2004).

Além da determinação dos parâmetros que formam a dose ser um ponto crítico no desenho dos estudos, como mencionado anteriormente, futuras análises histológicas devem levar em consideração a realização da coleta e fixação da pele em diversos momentos ao longo do processo de cicatrização, preferencialmente a cada 12 ou 24 horas, no intuito de ter um seguimento mais detalhado e, por sua vez, uma caracterização mais adequada da distribuição dos tipos de colágeno e da espessura dessas fibras em resposta à irradiação com laser de baixa intensidade em uma linha temporal definida.

5.5 A CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS SOB UMA ÓPTICA BIOMECÂNICA DA PELE REGENERADA

Em estudos de cicatrização de ferimentos, marcadores diferentes podem ser usados para mensurar a evolução do tecido, desde a morfometria das bordas para verificar diminuição do leito até marcadores moleculares, como enzimas, citocinas e espécies reativas de oxigênio (PATEL; MAHESHWARI; CHANDRA, 2016). Tão relevante quanto garantir a investigação da continuidade tecidual em uma região cicatrizada, é a investigação da resistência do tecido regenerado à aplicação de forças externas, no intuito de avaliar a integridade do tecido e fazer inferências quanto à possibilidade de recidiva do ferimento, especialmente importante nas úlceras venosas que têm alta incidência de recidivas.

Testes biomecânicos de ruptura de pele de roedores após indução de feridas são aplicados com protocolos bem estabelecidos e em diversas situações fisiopatológicas e diferentes tratamentos, como em animais diabéticos, em feridas incisionais e excisionais, em tratamentos com oxigenioterapia hiperbárica e administração de moléculas com ação cicatrizante (CASSETTARI et al., 2013; DANCÁKOVÁ et al., 2014; TUK et al., 2014). A partir de curvas de tensão por deslocamento, podemos chegar a variáveis como tensão de ruptura tecidual, rigidez e energia absorvida (JUNG; FISHER; WOO, 2009).

Testes feitos na pele de ratos saudáveis demonstraram que 21 dias após a indução do ferimento, a força de ruptura chegou a 50% da força de uma pele normal

enquanto a rigidez chegou a 97% comparada a pele controle (CHAO et al., 2013). A disponibilidade de estudos investigando a biomecânica da pele de ratos que tiveram ferimentos tratados com laser de baixa intensidade é pequena, logo a comparação entre as doses de laser aplicadas e os resultados encontrados fica limitada. Em um estudo em ferimentos no dorso de ratos (YASUKAWA et al., 2007), foi observado que a força de ruptura da pele cicatrizada do grupo que não recebeu radiação foi mais baixa, comparada com outros grupos que tiveram aplicação de laser. Outro estudo mais recente, que aplicou três radiações diferentes de laser (1, 5 e 10 J/cm²) com comprimento de onda de 660 nm, observou aumento da força de ruptura e rigidez da pele de ratos comparado aos controles, com exceção da dose mais alta (10 J/cm²) (SUZUKI; TAKAKUDA, 2016). Porém no primeiro estudo, a ferida foi incisional, e não excisional como em nosso estudo, e a potência do laser foi de apenas 17 mW, enquanto no segundo estudo foi realizada aplicação única de laser, logo após o procedimento de indução do ferimento, portanto a fase de cicatrização nesse contexto difere muito da análise de um tecido o qual o ferimento tenha sido induzido há mais de 12 dias.

Assim como observado anteriormente em análises histológicas (DO NASCIMENTO et al., 2004), os efeitos relacionados à potência (em mW) não parecem ter uma correlação positiva linear da resposta tecidual biomecânica. Em um estudo com aplicação de LBI em ratos com ferimentos no dorso, quatro doses foram utilizadas: comprimento de onda de 635 nm com potências de 4 mW e 15 mW e comprimento de onda de 670 nm também com potências de 4 e 15 mW (VASILENKO et al., 2010). Os maiores valores de tensão de ruptura foram encontrados nas doses 635nm-15mW e 670nm-4mW.

A deposição de colágeno durante a cicatrização é um processo fundamental no aumento da força de ruptura e na rigidez da pele (LAU et al., 2015). Nossos resultados não demonstraram diferença entre os grupos nessas características biomecânicas, o que poderia ser esperado tendo em vista que a distribuição da composição de colágeno, quanto ao tipo e espessura das fibras, também não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, como mencionado anteriormente. Contudo, o número amostral e o armazenamento de amostras por congelamento até a realização dos testes biomecânicos são limitações que possivelmente influenciaram no poder estatístico dessa análise de rigidez de tecido cutâneo.

6 CONCLUSÕES

O modelo proposto demonstrou que a oclusão venosa foi permanente durante todo o período avaliado, bloqueando o retorno venoso da veia femoral e, conseqüentemente, repercutindo no comportamento da microcirculação, reduzindo o pico de fluxo perto do décimo dia após o procedimento cirúrgico.

No que concerne ao tratamento de úlceras cutâneas nos membros com oclusão venosa, o laser de baixa intensidade, nos parâmetros utilizados nesse estudo, não influenciou a taxa de cicatrização, assim como a expressão e distribuição de colágeno.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A união de um modelo de insuficiência venosa associado a análise do tratamento de úlceras em um membro com déficit venoso representa uma nova abordagem pré-clínica na investigação do comportamento cicatricial de úlceras com base em distúrbios vasculares. Futuros trabalhos que possam avaliar a regulação de expressão gênica em células específicas atuantes no processo cicatricial, bem como analisar os tecidos numa perspectiva biomecânica e histomorfométrica em diferentes fases da cicatrização, irão fornecer informações relevantes quanto à efetividade e aos parâmetros de utilização de radiação específica para regeneração e remodelamento tecidual da pele.

REFERÊNCIAS

- AIKAWA, E. et al. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. **Circulation**, v. 113, n. 10, p. 1344–52, 14 mar. 2006.
- ALDER, G.; LEES, T. Foam sclerotherapy. **Phlebology: The Journal of Venous Disease**, v. 30, n. 2_suppl, p. 18–23, 9 nov. 2015.
- ALSAIGH, T. et al. Acute venous occlusion enhances matrix metalloprotease activity: Implications on endothelial dysfunction. **Microvascular research**, v. 81, n. 1, p. 108–16, jan. 2011.
- ALTOMARE, M. et al. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 6, p. 825–831, nov. 2009.
- ARAUJO, D. N. et al. Physical exercise for the treatment of non-ulcerated chronic venous insufficiency. In: DIAS, F. AL (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.
- AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 32, n. 1, p. 41–52, mar. 2013.
- BACK, T. L. et al. Limited range of motion is a significant factor in venous ulceration. **Journal of vascular surgery**, v. 22, n. 5, p. 519–23, nov. 1995.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, mar. 2005.
- BEEBE-DIMMER, J. L. et al. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 3, p. 175–84, mar. 2005.
- BEIDLER, S. K. et al. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 642–8, 2008.
- BEIDLER, S. K. et al. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. **Journal of vascular surgery**, v. 49, n. 4, p. 1013–20, abr. 2009.
- BENJAMIN, M. M.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. **EXS**, v. 103, p. 209–79, jan. 2012.
- BERGAN, J. J.; PASCARELLA, L.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Pathogenesis of primary chronic venous disease: Insights from animal models of venous hypertension. **Journal of vascular surgery**, v. 47, n. 1, p. 183–92, jan. 2008.
- BLALOCK, A. OXYGEN CONTENT OF BLOOD IN PATIENTS WITH VARICOSE VEINS. **Archives of Surgery**, v. 19, n. 5, p. 898, 1 nov. 1929.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRASSOLATTI, P. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy research and technique**, 8 fev. 2016.

BRAVERMAN, I. M. The Cutaneous Microcirculation. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 3–9, 1 dez. 2000.

BRAVERMAN, I. M.; KEH, A.; GOLDMINZ, D. Correlation of Laser Doppler Wave Patterns with Underlying Microvascular Anatomy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 95, n. 3, p. 283–286, 1 set. 1990.

BROWSE, N. L.; BURNAND, K. G. THE CAUSE OF VENOUS ULCERATION. **The Lancet**, v. 320, n. 8292, p. 243–245, 31 jul. 1982.

BRUNT, V. E. et al. Passive heat therapy improves cutaneous microvascular function in sedentary humans via improved nitric oxide-dependent dilation. **Journal of Applied Physiology**, v. 121, n. 3, p. 716–723, 1 set. 2016a.

BRUNT, V. E. et al. Acute hot water immersion is protective against impaired vascular function following forearm ischemia-reperfusion in young healthy humans. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 6, p. R1060–R1067, 1 dez. 2016b.

CAGGIATI, A. et al. Nomenclature of the veins of the lower limbs: an international interdisciplinary consensus statement. **Journal of vascular surgery**, v. 36, n. 2, p. 416–22, ago. 2002.

CASSETTARI, L. L. et al. Zinc sulphate administered by transdermal iontophoresis improves breaking strength of surgical wounds in skin of alloxan-induced diabetic rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 28, n. 8, p. 601–6, ago. 2013.

CATALDO, J. L.; DE GODOY, J. M. P.; DE BARROS, N. The use of compression stockings for venous disorders in Brazil. **Phlebology: The Journal of Venous Disease**, v. 27, n. 1, p. 33–37, 17 fev. 2012.

CHAO, C. Y. L. et al. In Vivo and ex Vivo Approaches to Studying the Biomechanical Properties of Healing Wounds in Rat Skin. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 135, n. 10, p. 101009, 20 set. 2013.

CHEN, L. et al. The murine excisional wound model: Contraction revisited. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 6, p. 874–877, 12 nov. 2015.

CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of biomedical engineering**, v. 40, n. 2, p. 516–33, fev. 2012.

CULLUM, N. et al. Systematic reviews of wound care management: (5) beds; (6) compression; (7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. **Health Technol.Assess.**, v. 5, n. 1366–5278 (Print), p. 1–221, 2001.

CULLUM, N. A.; AL-KURDI, D.; BELL-SYER, S. E. Therapeutic ultrasound for venous leg ulcers. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 6, p. CD001180, jan. 2010.

DA SILVA, J. P. et al. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. 1, p. 17–21, fev. 2010.

DALSING, M. C. et al. Animal models for the study of lower extremity chronic venous disease: lessons learned and future needs. **Annals of vascular surgery**, v. 12, n. 5, p. 487–94, set. 1998.

DALTON, S. J. et al. Abnormal extracellular matrix metabolism in chronically ischemic skin: a mechanism for dermal failure in leg ulcers. **The Journal of investigative dermatology**, v. 125, n. 2, p. 373–9, ago. 2005.

DANCÁKOVÁ, L. et al. Low-level laser therapy with 810 nm wavelength improves skin wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 4, p. 198–204, abr. 2014.

DANNO, K. et al. Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 17, n. 6, p. 261–5, dez. 2001.

DAVIDSON, J. M.; YU, F.; OPALENIK, S. R. Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 4, p. 142–148, maio 2013.

DE ARAÚJO, I. C. F. et al. The pernicious cycle of VLU in Brazil: epidemiology, pathogeny and auxiliary healing methods. **Journal of wound care**, v. 22, n. 4, p. 186–8, 190, 192–3, abr. 2013.

DE ARAUJO, T. Managing the Patient with Venous Ulcers. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 4, p. 326, 18 fev. 2003.

DE LIMA, F. J. C. et al. Is there a protocol in experimental skin wounds in rats using low-level diode laser therapy (LLDLT) combining or not red and infrared wavelengths? Systematic review. **Lasers in medical science**, 9 fev. 2016.

DE TAKÁTS, G. et al. THE IMPAIRMENT OF CIRCULATION IN THE VARICOSE EXTREMITY. **Archives of Surgery**, v. 18, n. 2, p. 671, 1 fev. 1929.

DEANA, A. M. et al. Fully automated algorithm for wound surface area assessment. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 21, n. 5, p. 755–61, jan. 2013.

DIX, F. P.; BROOKE, R.; MCCOLLUM, C. N. Venous disease is associated with an impaired range of ankle movement. **European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 25, n. 6, p. 556–61, jun. 2003.

DO NASCIMENTO, P. M. et al. A Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in

Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 6, p. 513–518, dez. 2004.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: A review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 6, p. 591–599, nov. 2004.

DYSON, M.; FRANKS, C.; SUCKLING, J. Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. **Ultrasonics**, v. 14, n. 5, p. 232–6, set. 1976.

EBERHARDT, R. T.; RAFFETTO, J. D. Chronic venous insufficiency. **Circulation**, v. 130, n. 4, p. 333–46, 22 jul. 2014.

EDWARD POLLOCK, F. et al. Measurement of hand microvascular blood flow with isolated cold stress testing and laser Doppler fluxmetry. **The Journal of Hand Surgery**, v. 18, n. 1, p. 143–150, 1 jan. 1993.

EKLÖF, B. et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. **Journal of vascular surgery**, v. 40, n. 6, p. 1248–52, dez. 2004.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 26, n. 2, p. 31–37, 1 fev. 2008.

FARVER, O. et al. Rates and Equilibrium of CuA to Heme a Electron Transfer in *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 6, p. 2131–2137, mar. 2006.

FRANÇA, C. M. et al. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 5, p. 1331–8, set. 2013.

GALLA, T.; HELLEKES, D.; FELLER, A.-M. Differentiation Between Arterial and Venous Vessel Occlusion by Simultaneous Measurement with Laser Doppler Flowmetry and Photoplethysmography. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 15, n. 01, p. 67–72, 8 jan. 1999.

GONÇALVES, R. V. et al. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 383–390, 22 fev. 2013.

HARTLEY, C. J. et al. Doppler velocity measurements from large and small arteries of mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 301, n. 2, p. H269-78, ago. 2011.

HASHMI, J. T. et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 2, n. 12 Suppl 2, p. S292-305, dez. 2010.

HISS, J. et al. Aging of wound healing in an experimental model in mice. **The American journal of forensic medicine and pathology**, v. 9, n. 4, p. 310–2, dez. 1988.

HOWLADER, M. H.; SMITH, P. D. Microangiopathy in chronic venous insufficiency: quantitative assessment by capillary microscopy. **European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 26, n. 3, p. 325–31, set. 2003.

HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 45, 8 nov. 2010.

INCANDELA, L. et al. Changes in microcirculation in venous ulcers with Essaven gel -a pilot, cross-over, placebo-controlled, randomized study. **Angiology**, v. 52 Suppl 3, p. S23-7, dez. 2001.

JENKINS, P. A.; CARROLL, J. D. How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. **Photomedicine and laser surgery**, v. 29, n. 12, p. 785-7, dez. 2011.

JIAN-PING, D. et al. Effects of pearl powder extract and its fractions on fibroblast function relevant to wound repair. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 2, p. 122-7, fev. 2010.

JUNG, H.-J.; FISHER, M. B.; WOO, S. L.-Y. Role of biomechanics in the understanding of normal, injured, and healing ligaments and tendons. **Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology : SMARTT**, v. 1, n. 1, p. 9, 20 maio 2009.

JUNGER, M. et al. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI). **Microcirculation.**, v. 7, n. 1073-9688 (Print), p. S3-12, 2000.

JÜNGER, M. et al. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI). **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 7, n. 6 Pt 2, p. S3-12, jan. 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential Staining of Collagens Type I, II and III by Sirius Red and Polarization Microscopy. **Arch. histol. jap**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The Influence of Tissue Section Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**, v. 74, p. 153-156, 1982.

KAN, Y. M.; DELIS, K. T. Hemodynamic effects of supervised calf muscle exercise in patients with venous leg ulceration: a prospective controlled study. **Arch.Surg.**, v. 136, n. 0004-0010 (Print), p. 1364-1369, dez. 2001.

KARU, T. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 20, n. 2, p. 143-148, mar. 2014.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 355-361, ago. 2005.

KAWADA, S.; ISHII, N. Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 192, n. 4, p. 541-9, maio 2008.

KO, J. et al. The Effects of ZD6474, an Inhibitor of VEGF Signaling, on Cutaneous Wound Healing in Mice¹. **Journal of Surgical Research**, v. 129, n. 2, p. 251-259, dez. 2005.

KORELO, R. I. G. et al. Wound healing treatment by high frequency ultrasound, microcurrent, and combined therapy modifies the immune response in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 20, n. 2, p. 133–141, abr. 2016.

KUBOTA, J. Defocused diode laser therapy (830 nm) in the treatment of unresponsive skin ulcers: a preliminary trial. **Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 6, n. 2, p. 96–102, jun. 2004.

LA ROCCA, G. et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British journal of cancer**, v. 90, n. 7, p. 1414–21, 5 abr. 2004.

LACROIX, P. et al. Epidemiology of venous insufficiency in an occupational population. **International angiology : a journal of the International Union of Angiology**, v. 22, n. 2, p. 172–6, jun. 2003.

LAL, C.; UNNI, S. N. Correlation analysis of laser Doppler flowmetry signals: a potential non-invasive tool to assess microcirculatory changes in diabetes mellitus. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 53, n. 6, p. 557–566, 10 jun. 2015.

LALKA, S. G.; UNTHANK, J. L.; NIXON, J. C. Elevated Cutaneous Leukocyte Concentration in a Rodent Model of Acute Venous Hypertension. **Journal of Surgical Research**, v. 74, n. 1, p. 59–63, jan. 1998.

LAU, P. S. et al. Biophotonic effect of diode laser irradiance on tensile strength of diabetic rats. **Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 86–9, abr. 2015.

LECLERE, F. M. et al. A prospective randomized study of 980 nm diode laser-assisted venous ulcer healing on 34 patients. **Wound.Repair Regen.**, v. 18, n. 1524–475X (Electronic), p. 580–585, nov. 2010.

MAMALIS, A.; SIEGEL, D.; JAGDEO, J. Visible Red Light Emitting Diode Photobiomodulation for Skin Fibrosis: Key Molecular Pathways. **Current dermatology reports**, v. 5, p. 121–128, 2016.

MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell and Tissue Research**, v. 351, n. 2, p. 255–268, 18 fev. 2013.

MEISSNER, M. H. Lower extremity venous anatomy. **Seminars in interventional radiology**, v. 22, n. 3, p. 147–56, set. 2005.

MEISSNER, M. H. et al. The hemodynamics and diagnosis of venous disease. **Journal of vascular surgery**, v. 46 Suppl S, n. 6, p. 4S–24S, dez. 2007.

MESTER, E. et al. Effect of laser rays on wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 122, n. 4, p. 532–535, out. 1971.

MESTER, E. et al. Stimulation of wound healing by laser rays. **Acta chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 13, n. 3, p. 315–24, jan. 1972.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 31–39, 1 jan. 1985.

MEYER, F. J. et al. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. **The British journal of surgery**, v. 95, n. 3, p. 319–25, mar. 2008.

MIGNON, C. et al. Photobiomodulation devices for hair regrowth and wound healing: a therapy full of promise but a literature full of confusion. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 10, p. 745–749, out. 2016.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, out. 2008.

NELSON, E. A.; BELL-SYER, S. E. Compression for preventing recurrence of venous ulcers. In: NELSON, E. A. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. CD002303.

NELSON, E. A.; HILLMAN, A.; THOMAS, K. Intermittent pneumatic compression for treating venous leg ulcers. In: NELSON, E. A. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. CD001899.

NUNAN, R.; HARDING, K. G.; MARTIN, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. **Disease models & mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1205–13, nov. 2014.

O'MEARA, S. et al. Compression for venous leg ulcers. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 11, p. CD000265, jan. 2012.

PAPAZOGLU, E. S. et al. Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. **Wound Repair and Regeneration**, v. 18, n. 4, p. 349–358, 11 maio 2010.

PARTOVI, S. et al. Correlation of skeletal muscle blood oxygenation level-dependent MRI and skin laser doppler flowmetry in patients with systemic sclerosis. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 40, n. 6, p. 1408–1413, dez. 2014.

PASCARELLA, L.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; BERGAN, J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. **Journal of vascular surgery**, v. 41, n. 2, p. 303–11, fev. 2005.

PATEL, S.; MAHESHWARI, A.; CHANDRA, A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 1, p. 46–55, 2 jan. 2016.

PEPLOW, P. V.; BAXTER, G. D. Gene Expression and Release of Growth Factors During Delayed Wound Healing: A Review of Studies in Diabetic Animals and Possible Combined Laser Phototherapy and Growth Factor Treatment to Enhance Healing. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 11, p. 617–636, nov. 2012.

PIPINOS, I. I. et al. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 295, n. 1, p. R290-6, jul. 2008.

POCOCK, E. S. et al. Cellular and molecular basis of Venous insufficiency. **Vascular cell**, v. 6, n. 1, p. 24, jan. 2014.

PORTER, J. M.; MONETA, G. L. Reporting standards in venous disease: An update. **Journal of Vascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 635–645, 1 abr. 1995.

POSTEN, W. et al. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 334–340, 21 mar. 2006.

QUILICI, B. et al. Comparison of reduction of edema after rest and after muscle exercises in treatment of chronic venous insufficiency. **International Archives of Medicine**, v. 2, n. 1, p. 18, 14 jul. 2009.

RAFFETTO, J. D. Inflammation in chronic venous ulcers. **Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine**, v. 28 Suppl 1, p. 61–7, mar. 2013.

REDDY, G. K. Photobiological Basis and Clinical Role of Low-Intensity Lasers in Biology and Medicine. **Journal of Clinical Laser Medicine Surgery**, v. 22, n. 2, p. 141–150, 8 abr. 2004.

REIS, S. R. A. et al. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 26, n. 4, p. 307–13, ago. 2008.

RICCI, S. et al. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 54, n. 8, p. 1281–90, 7 jan. 2016.

RICH, L.; WHITTAKER, P. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING: A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. **Braz. J. morphol. Sci**, v. 22, n. 2, p. 97–104, 2005.

RIPPON, M. et al. The economic impact of hard-to-heal leg ulcers. **Wounds UK**, v. 3, n. 2, p. 58–69, 2007.

ROCHE, C.; WEST, J. A controlled trial investigating the effect of ultrasound on venous ulcers referred from general practitioners. **Physiotherapy**, v. 70, n. 12, p. 475–477, 1984.

SAWICKI, G. et al. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 269, n. 1–2, p. 209–16, jan. 2005.

SILVA, A. A. DA et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 210–6, ago. 2013a.

SILVA, A. A. DA et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet.Laser Ther.**, v. 15, n. 1476–4180 (Electronic), p. 210–216, ago. 2013b.

SILVA, F. S. DA et al. Desenvolvimento de sistema para reprodução e análise de

curvas força-distensão em tendões calcâneos de ratos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 15–21, 2013c.

SILVA, F. S. DA et al. Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 229–234, set. 2014.

SILVA, F. S. et al. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 29, p. 37–44, 2017.

SMITH, P. C. The causes of skin damage and leg ulceration in chronic venous disease. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 5, n. 3, p. 160–8, 1 set. 2006.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, jan. 2005.

SÖRENSEN, B. M. et al. Prediabetes and Type 2 Diabetes Are Associated With Generalized Microvascular Dysfunction Clinical Perspective. **Circulation**, v. 134, n. 18, p. 1339–1352, 1 nov. 2016.

STAFFORD, R. J. et al. Laser-induced thermal therapy for tumor ablation. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 38, n. 1, p. 79–100, 2010.

SUZUKI, R.; TAKAKUDA, K. Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 8, p. 1683–1689, 5 nov. 2016.

TAJHYA, R. B.; PATEL, R. S.; BEETON, C. Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1579, p. 231–244, 2017.

TCHANQUE-FOSSUO, C. N. et al. A Systematic Review of Low-Level Light Therapy For Treatment of Diabetic Foot Ulcer. **Wound Repair and Regeneration**, p. n/a-n/a, 7 jan. 2016.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 878, p. 121–35, jan. 2012.

TUK, B. et al. Hyperbaric oxygen therapy to treat diabetes impaired wound healing in rats. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108533, jan. 2014.

VAN BEMMELEN, S. P. et al. A study of valve incompetence that developed in an experimental model of venous hypertension. **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 121, n. 9, p. 1048–52, set. 1986.

VASILENKO, T. et al. The Effect of Equal Daily Dose Achieved by Different Power Densities of Low-Level Laser Therapy at 635 and 670 nm on Wound Tensile Strength in Rats: A Short Report. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 281–283, abr. 2010.

WELLS, P. N. T. Blood Flow: Insights from Ultrasound. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 204, n. 1, p. 1–20, 5 mar. 1990.

WOLLINA, U.; ABDEL-NASER, M. B.; MANI, R. A review of the microcirculation in skin in patients with chronic venous insufficiency: the problem and the evidence available for therapeutic options. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 5, n. 3, p. 169–80, set. 2006.

WYSOCKI, A. B.; STAIANO-COICO, L.; GRINNELL, F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. **The Journal of investigative dermatology**, v. 101, n. 1, p. 64–8, jul. 1993.

YANG, D. Changes in calf muscle function in chronic venous disease. **Cardiovascular Surgery**, v. 7, n. 4, p. 451–456, jun. 1999.

YASUKAWA, A. et al. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. **The Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 8, p. 799–806, ago. 2007.

ZERVIDES, C.; GIANNOUKAS, A. D. Historical Overview of Venous Valve Prostheses for the Treatment of Deep Venous Valve Insufficiency. **Journal of Endovascular Therapy**, v. 19, n. 2, p. 281–290, abr. 2012.

**APÊNDICE A – ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE-2 EM COMPARAÇÃO
AO GRUPO CONTROLE**



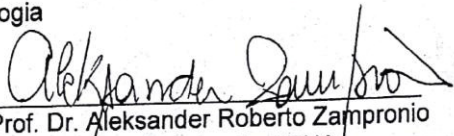
TABELA 5 – ATIVIDADE DE METALOPROTEINASE-2 EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO CONTROLE

	IV (n=5)	L12 (n=5)	L24 (n=6)	CL12 (n=5)
MMP-2	-16,5%±10,7*	-11,7%±15,2	33,4%±8,5	-17,3%±4,9*
ProMMP-2	-26,0%±9,1*	-30,3%±21,9*	35,2%±8,6	-8,3%±16,6

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: *diferença significativa em relação ao grupo L24.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFPR

 <p>UFPR UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</p>	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)</p>	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <p>Nº 861</p> </div>
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.</p>		
<p>STATEMENT</p>		
<p>The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.</p>		
<p>PROCESSO/PROCESS: 23075.054876/2014-10</p>		
<p>APROVADO/APPROVAL: 10/02/2015 – R.O. 01/2015</p>		
<p>TÍTULO/TITLE: Efeitos do ultrassom terapêutico e laserterapia na cicatrização de úlceras em ratos com insuficiência venosa</p>		
<p>AUTORES/AUTHORS: Fernando Augusto Lavezzo Dias, Diego Neves Araújo, Andrielle Elaine Capote, Rosalvo T.H. Fogaça, Eduardo Souza Neto</p>		
<p>DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia</p>		
<p> Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio Coordenador da CEUA</p>		

ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UIC

UIC UNIVERSITY OF ILLINOIS
AT CHICAGO

Office of Animal Care and
Institutional Biosafety Committees (MC 672)
Office of the Vice Chancellor for Research
206 Administrative Office Building
1737 West Polk Street
Chicago, Illinois 60612-7227

July 13, 2017

Beata M. Wolska
Medicine/Cardiology
M/C 715

Dear Dr. Wolska:

The protocol indicated below was reviewed at a convened ACC meeting in accordance with the Animal Care Policies of the University of Illinois at Chicago on **6/20/2017**. *The protocol was not initiated until final clarifications were reviewed and approved on 7/12/2017. The protocol is approved for a period of 3 years with annual continuation.*

Title of Application: Arterial and Venous Insufficiency in Lower Limb of Rats

ACC Number: 17-101

Initial Approval Period: 7/12/2017 to 6/20/2018

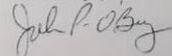
Current Funding: *Currently protocol NOT matched to specific funding source. Modification will need to be submitted prior to Just in time or acceptance of award to match protocol to external funding source. All animal work proposed in the funding application must be covered by an approved protocol.*

UIC is the only performance site currently approved for this protocol.

This institution has Animal Welfare Assurance Number A3460.01 on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), NIH. **This letter may only be provided as proof of IACUC approval for those specific funding sources listed above in which all portions of the funding proposal are matched to this ACC protocol.**

In addition, all investigators are responsible for ensuring compliance with all federal and institutional policies and regulations related to use of animals under this protocol and the funding sources listed on this protocol. Please use OLAW's "What Investigators Need to Know about the Use of Animals" (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/InvestigatorsNeed2Know.pdf>) as a reference guide. Thank you for complying with the Animal Care Policies and Procedures of UIC.

Sincerely yours,



John P. O'Bryan, PhD
Chair, Animal Care Committee
JPO /ss

cc: BRL, ACC File, Shamim Chowdhury, Diego Neves Araujo