

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPITELIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM FERIDAS  
RECENTES DE COELHOS TRATADOS COM MEMBRANA  
AMNIÓTICA CANINA E/OU LASERTERAPIA**

**Nazilton de Paula Reis Filho**

**Médico Veterinário**

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPITELIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM FERIDAS  
RECENTES DE COELHOS TRATADOS COM MEMBRANA  
AMNIÓTICA CANINA E/OU LASERTERAPIA**

**Nazilton de Paula Reis Filho**

**Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Cirurgia Veterinária.**

**2015**

**FICHA VERSO**

# CERTIFICADO

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**NAZILTON DE PAULA REIS FILHO** – nascido no dia 08 de janeiro de 1988, natural de Campos do Jordão– SP. Graduado no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná – Câmpus Luiz Meneghel, no ano de 2011. Desenvolveu dois projetos de iniciação científica, com bolsa concedida pela Fundação Araucária, sob orientação da Profa. Dra. Celmira Calderón, na área de oncologia veterinária. Durante a graduação, participou de vários cursos e estágios, sendo a maioria relacionada com as áreas de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Em 2011, no último ano de graduação, realizou *externship* no setor de oncologia da Michigan State University, Estados Unidos da América, totalizando cerca de 600 horas de acompanhamento da rotina, orientado pela Profa. Dra. Barbara Kitchell. No período de 2012 a 2014 foi residente na área de Cirurgia Veterinária de Pequenos Animais, sob orientação do Profa. Dra. Mirian Siliane Baptista de Souza, na Universidade Estadual de Londrina. Neste período, publicou vários resumos científicos em anais de congressos, além de participar de projetos de pesquisa científica. Em Outubro de 2013 foi aprovado no Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Cirurgia Veterinária, na FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, tendo iniciado as atividades em Março de 2014. Ministrou palestras e aulas durante o período de residência e de mestrado, abordando temas relacionados às áreas de Cirúrgica de Pequenos Animais e de Oncologia Veterinária. Desde então, também participa do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Em Junho de 2015 foi aprovado no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, na mesma instituição.

## DEDICATÓRIA

Ao meu exemplo de vida, dedicação, força, persistência e honestidade. A pessoa que me ensinou a sentir e a ofertar o mais nobre dos sentimentos, o Amor. Dedico, como uma ínfima amostra de minha gratidão, a Raquel Rotondaro das Chagas, minha Mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

Dou início aos meus agradecimentos com um sincero desejo, que este breve resumo de gratidão possa transparecer ao leitor da dissertação, da forma mais fiel possível, o quanto o desenvolvimento do trabalho foi dependente dos nomes que serão citados abaixo.

Agradeço muito a Deus, por ter me proporcionado tantos momentos desafiantes, alegres, alguns tristes, durante este período. Agradeço, sobretudo, pela forma a qual me guiou para lidar com cada um destes, e descobrir qual era a mensagem de aprendizado por trás das situações. Agradeço por tanto ter evoluído e me tornado uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, por todas as oportunidades profissionais, pela confiança, pela orientação, pelo trabalho em conjunto. Obrigado por me integrar como parte de sua equipe, realizando um sonho pessoal.

Aos Professores, doutores, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e Antonio Sergio Ferraudó. Um sincero agradecimento a dois profissionais que honram o título de docente e que não mediram esforços para me ajudar.

A toda a equipe que compôs o grupo do meu experimento, Marília Ferreira, Ana Pascoli, Rafaela Viéra, Paloma Silva, Igor Senhorello, Rafael Oliveira, Profa. Paola e Stephanny, por toda a ajuda e dedicação. Sem vocês não teria dado tão certo.

A toda equipe do Serviço de Oncologia Veterinária e dos Residentes e funcionários do Hospital Veterinário Unesp – FCAV. Pessoas de convivência diária neste período que farão parte eternamente das conquistas neste local.

Aos amigos pessoais que fazem tanto falta no dia a dia, mas que estão sempre presentes nas lembranças, Douglas Gaitkoski, Luiza Pachemshy, Leonardo Schmidt, André Lopes, Cynthia Fraga, Bruno Elias, Guilherme Matteucci, Laisa Camargo, Luiza Padovan, Liana Marcelino, Aquiles Muraro e André Tobias.

Aos amigos conquistados durante o período do mestrado, separados neste parágrafo por terem sido tão valiosos na minha vida que se tornaram elementos fundamentais deste trabalho. Rafael Oliveira, Marília Ferreira, Igor Senhorello, Paulo Jark, Oscar Matiz, Ana Pascoli e Rafaela Oliveira. Obrigado por tudo!

A minha família, Yvone (avó), Rodrigo (tio), Isis (prima), Ro (primo), Micaela (prima); e a família da minha esposa, Pereira (sogro – *in memorian*), Sônia (sogra), Gregório (cunhado), Fabiane (cunhada), Fernanda (cunhada) e Edivar (cunhado). Acima de tudo por terem feito o papel de família, sem palavras para agradecer.

Aquela que zela pela parte mais importante de mim, aquela que abre mão dos seus sonhos para sonhar os meus, aquela que faz tudo parecer mais simples e menos dolorido, aquela que tem o sorriso mais sincero e puro que já vi. Foi essa aquela que esteve o tempo todo ao meu lado. Carla Gomes de Araújo, minha esposa, agradeço a você.

Aquele que é a pessoa que mais teve que ceder para que eu estivesse aqui hoje, e fez isso como uma superioridade espiritual exemplar. Aquele que é meu melhor amigo, que faz minha cabeça realmente esquecer tudo que é menos importante, que me faz ter força, a quem eu me anulo sem medir consequências. E por tudo que de bem ele me faz, pede apenas para brincar de super-herói em troca. Meu filho Heitor Gomes de Araújo Reis, você é tudo na minha vida, muito obrigado!

## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais .....	1
1. Introdução .....	1
2. Revisão da Literatura .....	2
2.1 Sistema tegumentar.....	2
2.1.2 Irrigação vascular cutânea.....	3
2.2 Cicatrização da pele .....	4
2.3 Enxertos cutâneos .....	5
2.4 Membranas biológicas .....	9
2.4.1 Membrana amniótica .....	9
2.4.1.1 Propriedades relevantes .....	11
2.5 Fototerapia.....	11
2.5.1 Aplicação clínica do LBI.....	14
2.5.2. Interação do LBI no processo cicatricial .....	15
Referências.....	16
CAPÍTULO 2 – Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia .....	24
ABSTRACT e RESUMO .....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
Coleta e conservação das membranas amnióticas .....	26

Seleção dos pacientes para o procedimento e protocolo anestésico. ....	26
Procedimento cirúrgico .....	26
Protocolo terapêutico pós-operatório .....	28
Avaliação física e macroscópica .....	29
Processamento das amostras .....	29
Avaliação microscópica .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
Análise macroscópica .....	31
Análise microscópica .....	34
CONCLUSÃO .....	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICES.....	44

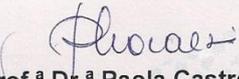
**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 018677/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Uso de membrana amniótica canina como estimuladora de epitelização em enxertos cutâneos totais em coelhos"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 09 de outubro de 2014.

Jaboticabal, 09 de outubro de 2014.

  
**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## **EPITELIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS EM FERIDAS RECENTES DE COELHOS TRATADOS COM MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA E/OU LASERTERAPIA**

**RESUMO** - A enxertia cutânea é uma técnica cirúrgica simples e bastante útil para o reparo de feridas, principalmente nas quais existe dificuldade da aplicação do fechamento primário, ou de outras técnicas reconstrutivas. Entretanto, para a sobrevivência do enxerto, é necessário que o leito da ferida esteja saudável e com a presença de um tecido de granulação exuberante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da membrana amniótica e da laserterapia como potenciais estimulantes da cicatrização em enxertos aplicados em feridas sem tecido de granulação. Para isso, foram utilizados 42 coelhos divididos em quatro grupos de tratamento, grupo controle (GC), grupo membrana (GM), grupo laser (GL) e grupo membrana e laser (GML), submetidos a avaliações macro e microscópicas dos enxertos. Na avaliação macroscópica foi possível notar que os pacientes dos grupos onde a membrana amniótica foi utilizada com o intuito de estimular a reepitelização (GM e GML) apresentaram acentuada reação inflamatória, falha de integração do enxerto e consequente necrose do mesmo. Já os pacientes do grupo GL apresentaram melhor aspecto do enxerto no último dia de avaliação. Na análise microscópica, observou-se intensa integração do enxerto à derme, reepitelização acentuada e escassas células inflamatórias no local do enxerto nos pacientes do grupo GL. O oposto foi observado nos pacientes dos grupos GM e GML, onde aparentemente a presença da membrana amniótica induziu resposta inflamatória bastante consistente na região adjacente à membrana e ao enxerto, resultando em rejeição da membrana. Por último, a formação de colágeno não se correlaciona com outros fatores como inflamação e necrose, em nenhum dos grupos de tratamento. Desta forma, é possível afirmar que a laserterapia mostrou ser efetiva, contribuindo para o processo cicatricial e integração do enxerto. Já a membrana amniótica canina não deve ser utilizada para este fim, pois provoca intensa reação inflamatória além de impedir a nutrição do enxerto.

**Palavras-chave:** epitelização, enxerto cutâneo, laserterapia, membrana amniótica.

## **SKIN GRAFT EPITHELIALIZATION IN RABBIT FRESH WOUNDS TREATED WITH AMNIOTIC MEMBRANE AND/OR LASER THERAPY**

**ABSTRACT** - Skin grafting is a simple surgical technique and useful to repair wounds, especially those where there is a difficulty to apply primary closure skin or other reconstructive techniques. However, for the graft survival it is necessary that the healthy wound bed and the presence of an exuberant granulation tissue. This study aimed to evaluate the application of amniotic membrane and laser therapy as potential stimulating healing in grafts applied in wounds without granulation tissue. For this, we used 42 rabbits divided into four treatment groups, control group (CG), membrane group (MG), laser group (LG) and membrane and laser group (MLG), submitted to macroscopic and microscopic evaluation. The macroscopic examination was possible to note that the patients of the groups where the amniotic membrane was used in order to stimulate re-epithelialization (MG and MLG) presented evidences associated with severe inflammatory reaction, graft integration failure and consequent necrosis. In LG patients apparently had the best aspect of the graft in the last valuation date. On the microscopic examination, there was intense integration of the graft to the dermis, high reepithelialization level and scarce inflammatory cells in the graft site of LG group patients. The opposite was observed in patients in the MG and MLG groups, where apparently the presence of amniotic membrane seems to have induced very consistent inflammatory response in the region adjacent to the membrane and the graft, evincing that there was a rejection of the membrane. Finally, the collagen formation does not correlated with other factors such as inflammation and necrosis in any of the treatment groups. We can conclude that laser therapy was effective, contributing to the healing process and integration of the graft. Thus, the canine amniotic membrane should not be used for this purpose because it causes intense inflammatory reaction besides to avoid graft nutrition.

**Keywords** - amniotic membrane, epithelialization, laser therapy, skin grafts

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografias do procedimento cirúrgico de enxertia cutânea em coelhos. A) Demarcação da região doadora (RD) utilizando molde plástico. B) Demarcação da RD (seta vermelha) e região receptora (RR) (seta preta). C e D) Incisão de pele para retirada dos fragmentos cutâneos. E) Dissecção do tecido subcutâneo do enxerto. F) Realização de fenestras no enxerto. G) Colocação do enxerto sobre a RR. H) Fixação do enxerto no leito receptor com pontos simples interrompidos (seta preta) e sutura da RD com pontos simples contínuos. Jaboticabal, 2015. ....27
- Figura 2.** Fotografia representando o preparo da membrana amniótica canina para a aplicação na região receptora dos coelhos do grupo membrana e grupo membrana e laser submetidos à enxertia cutânea. A) Notar a realização de perfurações realizadas na membrana com agulha 40x16 para permitir a aderência e embebição plasmática do enxerto. B) Colocação da membrana amniótica no leito receptor e sua fixação com pontos de ancoragem. Jaboticabal, 2015.....28
- Figura 3.** Figuras demonstrando a técnica de laserterapia aplicada no enxerto cutâneo dos coelhos do grupo laser (GL) e do grupo membrana e laser (GML). A) Representação esquemática das áreas de pré-determinadas para a aplicação da laserterapia (círculos vermelhos) na área adjacente ao enxerto cutâneo (seta preta) dos coelhos do GL e do GML. B) Fotografia representando a aplicação da laserterapia em enxerto cutâneo no momento pós-operatório imediato em um coelho do GL. Jaboticabal, 2015. ....29
- Figura 4.** Imagem representativa da análise de imagem da área de formação de colágeno e tecido de granulação em enxerto cutâneo em coelhos do grupo laser. Foi utilizado o *software* Image-Pro Plus 4.0<sup>®</sup> para a análise em porcentagem de área. A porção em vermelho representa o colágeno, e a parte amarela a epiderme. Jaboticabal, 2015. ....30
- Figura 5.** Fotografias ilustrativas de enxertos cutâneos em coelhos dos diferentes grupos de tratamento, durante os três momentos distintos da avaliação

macroscópica. A) Aparência macroscópica do enxerto no 3º dia de pós-operatório (PO) de coelho do grupo controle (GC). B) 7º dia de PO do grupo GC. C) 15º dia de PO do grupo GC, observa-se área de necrose (seta) e integração parcial do enxerto (círculo). D) 3º dia de PO do grupo membrana (GM). E) 7º dia de PO do grupo GM. F) 15º dia de PO do grupo GM, observar secreção purulenta (seta). G) 3º dia de PO do grupo laser (GL). H) 7º dia de PO grupo GL. I) 15º dia de PO do grupo GL, notar integração total do enxerto. J) 3º dia de PO do grupo membrana e laser (GML). K) 7º dia de PO de coelho do grupo GML, observar área de necrose (seta). L) 15º dia de PO grupo GML, área de necrose (seta). Jaboticabal, 2015. ....32

**Figura 6.** Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples da avaliação macroscópica da enxertia cutânea dos pacientes do grupo controle (GC). Os parâmetros presentes dentro do círculo apresentaram associação estatisticamente significativa, e os dentro dos retângulos embora houvesse associação, não foram significativas. Legenda: edema ausente (EAUS); edema moderado (EMOD); edema intenso (EINT); coloração do enxerto pálida (CEPAL); coloração do enxerto rósea (CEROS); coloração do enxerto escuro (CEESC); quantidade de secreção ausente (QSAUS); quantidade de secreção moderada (QSMOD); quantidade de secreção intensa (QSINT). Os números 3, 7 e 15 correspondem aos dias das análises macroscópica. Jaboticabal, 2015. ....33

**Figura 7.** Média percentual da quantidade de edema no enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: edema ausente (EAUS); edema moderado (EMOD) e edema intenso (EINT); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015. ....34

**Figura 8.** Média percentual da coloração do enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: coloração pálida (CEPAL); coloração rósea (CEROS); coloração escura (CEESC); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015. ....35

Figura 9. Média percentual da quantidade de secreção no enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: quantidade de secreção ausente (QSAUS); quantidade de secreção moderada (QSMOD); quantidade de secreção intensa (QSINT); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015. ....35

**Figura 10.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de transição (pontilhado) entre a epiderme original (estrela vermelha), com os anexos cutâneos (\*) e o segmento reepitelização (seta vermelha) associada à proliferação de colágeno (estrela preta). Na superfície epidermal verifica-se o enxerto desvitalizado e não integrado à região receptora (setas pretas / grupo controle). B) Derme superficial com acentuado infiltrado inflamatório (cabeça de seta), foco de reepitelização parcial (seta vermelha) e presença de enxerto degenerado (setas pretas) e não integrado à derme (seta azul / grupo membrana). C) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e área de reepitelização (seta vermelha), com integração completa do enxerto cutâneo (estrela preta / grupo laser). D) reepitelização completa da pele (seta vermelha), sem integração do enxerto que encontra-se degenerado (setas pretas / grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015. ....36

**Figura 11.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Notar a presença da membrana amniótica (seta) entre o enxerto (cabeça de seta) e a região receptora (estrela / grupo membrana). Objetiva 4x. B) Presença da membrana amniótica (seta) induzindo intensa resposta inflamatória (estrelas / grupo membrana). Objetiva de 20x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015. .37

**Figura 12.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de transição onde o enxerto ainda está integrado à pele, embora necrótico (estrela). Há área de tecido de granulação e área com reepitelização parcial (cabeça de seta). B) Presença de inflamação moderada, junto a área em que houve reepitelização parcial (estrela). Observar que a área onde o enxerto está integrado

não há reepitelização (cabeça de seta / grupo controle). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.....37

**Figura 13.** Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla dos achados microscópicos entre todos os grupos de tratamento do enxerto cutâneo em coelhos. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegro (RELI); relação enxerto x pele degenerado (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderado (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC). Jaboticabal, 2015.....38

**Figura 14.** Média percentual dos parâmetros da avaliação microscópica em cada grupo de tratamento dos coelhos submetidos à enxertia cutânea. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegro (RELI); relação enxerto x pele degenerado (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderado (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015. ....40

**Figura 15.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de intensa formação de colágeno jovem abaixo da área de reepitelização (estrela) em contraste com área do epitélio original, apresentando colágeno maduro (cabeça de seta / grupo controle). B) Área onde a formação de colágeno ocorreu pobremente devido a intensa inflamação local (cabeça de seta / grupo membrana). C) Presença de formação de colágeno maduro e estruturado com áreas de

inflamação discreta (cabeça de seta / grupo laser). D) Área abaixo do epitélio reepitelizado, onde a formação de colágeno foi discreta (triângulo / grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração Tricômico de Masson. Jaboticabal, 2015. ....41

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **1. Introdução**

A cirurgia reconstrutiva constitui-se na utilização de uma variedade de técnicas para o reparo de lesões de origem hereditária ou adquiridas (PAVLETIC, 2007; MACPHAIL, 2013). Frequentemente, o tratamento de lesões cutâneas extensas pode ser problemático em diversas situações clínicas na Medicina e na Medicina Veterinária, como em excisões de neoplasias, feridas por mordeduras, atropelamentos, queimaduras entre outras (SUPP; BOYCE, 2005).

Com o avanço da engenharia cirúrgica e da própria medicina, muito tem-se progredido na busca de novos materiais e técnicas, com o objetivo do retorno funcional do tecido lesado próximo ao normal. Entretanto, ainda existe um campo vasto para busca de novas técnicas e melhoria daquelas já conceituadas (SUPP; BOYCE, 2005). Historicamente, o manejo de feridas em Medicina Veterinária resumia-se a cicatrização por segunda intenção ou técnicas reconstrutivas relativamente simples. O desenvolvimento de técnicas como os retalhos de padrão axial, retalhos musculares pediculados, retalhos microvasculares e enxertos, expandiu o arsenal de opções para o cirurgião reconstrutor (WILLIAMS; FOWLER, 1999).

O uso da técnica de enxertia cutânea é bastante útil no reparo de lesões, principalmente na quais devido a fatores anatômicos, é difícil o emprego de outras técnicas reconstrutivas. Embora amplamente utilizada na Medicina, a enxertia cutânea tem seu uso limitado em animais domésticos, pois é necessário que a ferida apresente um leito com tecido de granulação saudável, ausência de tecido necrótico, infecção e corpos estranhos para que se alcance o resultado esperado. Desta forma, até que se alcance este ambiente ideal, a ferida deverá ser tratada por segunda intenção, o que inclui trocas frequentes de curativos, aumento no tempo do tratamento e até mesmo sedação do paciente em alguns casos. Todos estes fatores oneram o tratamento e requererem disponibilidade e cuidado do proprietário, diminuindo ainda mais a indicação da técnica (FOWLER, 2006).

Devido à problemática exposta, este trabalho teve por objetivo comparar o emprego da membrana amniótica canina e da fototerapia como potenciais

estimulantes da cicatrização de enxerto cutâneos em coelhos, com o intuito de proporcionar processo cicatricial mais eficiente, ampliar a aplicabilidade da técnica e diminuir seus custos. Para isso, a enxertia cutânea foi realizada logo após a criação da ferida, ou seja, sem a formação de tecido de granulação, seguida pela aplicação dos tratamentos propostos e avaliação macro e microscópica do enxerto.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Sistema tegumentar**

A pele, ou tegumento, é o maior órgão do corpo podendo corresponder a até 24% do peso corporal de um animal filhote, enquanto em adultos corresponde a cerca de 12% (PAVLETIC, 2007; PAVLECTIC, 2010). Funcionalmente, este órgão é responsável pela primeira linha de defesa do corpo contra microorganismos, sendo o estrato córneo responsável por proteção contra dessecação. Dentre outras funções da pele estão a produção de vitamina D, reservatório de eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas (MULLER; MILLER; GRIFFIN, 2001).

A pele é composta de duas camadas, uma camada epitelial designada epiderme, e uma camada de tecido conectivo chamado de derme ou cório. A derme repousa sobre uma base de tecido conjuntivo, o subcutâneo, que é composto em parte por gordura e parte por camada fibrosa (CAMPBELL; LICHTENSTEIGER, 2004; PATERSON, 2008).

A epiderme é composta por epitélio escamoso estratificado queratinizado em sua superfície. Esta camada é fina e avascular, sendo o grau de queratinização variável com a quantidade de esforço mecânico e atrito a qual determinada porção dessa camada irá ser sujeitada. A epiderme provida de pelos consiste em quatro camadas principais: o estrato cilíndrico ou basal, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato córneo. No estrato germinativo, que é composto pelo estrato cilíndrico e pelo espinhoso, a atividade mitótica é responsável pela proliferação das células epidérmicas (CAMPBELL; LICHTENSTEIGER, 2004; PATERSON, 2008; PAVLETIC, 2010).

A derme consiste de fibras colágenas, reticulares e elásticas, circundadas por uma matriz mucopolissacarídica composta de ácido hialurônico e ácido condroitino-sulfúrico. Esta camada é vascularizada e também possui nervos, músculos, folículos pilosos e estruturas glandulares. A derme nutre a epiderme e também fornece sustentação. A pele provida de pelos possui ainda os anexos que são os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, sendo todas estas estruturas de origem ectodérmica (CAMPBELL; LICHTENSTEIGER, 2004).

### 2.1.2 Irrigação vascular cutânea

Os vasos musculocutâneos são vasos primários responsáveis pelo suprimento da pele e ficam localizados de forma perpendicular à derme. Este tipo de vascularização é limitada à espécie humana, aos primatas e suínos. Os vasos que suprem a pele dos caninos e felinos seguem paralelamente à pele e são vasos cutâneos diretos. Tal diferença tem importância relevante visto a dificuldade da aplicabilidade da mesma técnica cirúrgica entre estas espécies (MACPHAIL, 2013).

O plexo subdérmico, ou plexo profundo, é formado por artérias e veias terminais que ramificam-se a partir de vasos cutâneos diretos. O plexo é responsável por suprir bulbos e folículos pilosos, glândulas tubulares, a porção mais profunda dos ductos glandulares e os músculos eretores dos pelos; o plexo cutâneo (intermediário), por sua vez supre as glândulas sebáceas e reforça as redes de capilares que cercam os folículos pilosos, os ductos das glândulas tubulares e os músculos eretores dos pelos. O plexo subpapilar (superficial) situa-se na camada externa da derme e nutre a epiderme através de alças capilares projetadas em sua direção. O sistema de alças capilares é menos desenvolvido em cães e gatos do que nos seres humanos e suínos (PAVLETIC, 1980; MACPHAIL, 2013).

O músculo panículo é uma coleção de delgados músculos no subcutâneo. Em áreas onde existe músculo do panículo, como no músculo cutâneo do tronco, músculo platisma, esfíncter cervical superficial e profundo, músculo prepuccial e músculo supramamário, o plexo situa-se tanto superficial como profundamente em relação a ele. Desta forma, o cirurgião deve divulsionar o plano fascial abaixo da musculatura cutânea a fim de preservar a integridade do plexo subdérmico. Sendo o

panículo ausente, como nas extremidades, o plexo subdérmico segue na superfície profunda da derme, devendo ser divulsionado bem abaixo de sua superfície (PAVLETIC, 1980; MACPHAIL, 2013).

## 2.2 Cicatrização da pele

A cicatrização de feridas é um processo complexo mediado por eventos bioquímicos por meio da liberação de citocinas e fatores de crescimento. O início do processo cicatricial é dado pelas plaquetas seguido do domínio de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos com a finalidade da síntese do tecido conjuntivo e a formação de um novo revestimento de epitélio por queratinócitos, sendo este evento dividido em quatro estágios: inflamação, debridamento, reparo e maturação (HUNT; HOPF, 1997; DOUGHTY; FAAN, 2005; DERNELL, 2006; FAHIE; SHETTKO, 2007; ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; PITZER; PATEL, 2011).

A fase inflamatória compreende a reposta vascular e celular frente à agressão imediata. Inicialmente envolve vasoconstrição, com a finalidade de conter a hemorragia, mas é seguida por vasodilatação, que permite maior migração do fluido transudado para o local da ferida. A grande característica desta fase é a migração de leucócitos dentro das primeiras 6 horas. Mediadores de matriz extracelular promovem marginalização, adesão e extravasamento de neutrófilos que irão degradar os tecidos necróticos, fagocitar bactérias e debris. Ainda neste momento irá ocorrer a migração de monócitos que são células essenciais para a cicatrização da ferida. Os monócitos vão se diferenciar em macrófagos e irão sintetizar fatores de crescimento que são essenciais na formação de tecido, na remodelação, como fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de necrose tumoral, interleucinas, matriz de metaloproteinases e seus inibidores teciduais (BAUER; AIKEN, 1989; DOUGHTY; FAAN, 2005; DERNELL, 2006; FAHIE; SHETTKO, 2007; PITZER; PATEL, 2011). Macroscopicamente é possível observar coágulos de sangue fresco, exsudato variando de serosanguinolento a purulento e superfície da ferida sem tecido de granulação (FAHIE; SHETTKO, 2007).

A fase de reparo inicia-se dentre três a cinco dias após o trauma, quando ocorrem os processos de angiogênese, fibroplasia e epitelização (HUNT; HOPF, 1997; DOUGHTY; FAAN, 2005; DERNELL, 2006; FAHIE; SHETTKO, 2007; ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; PITZER; PATEL, 2011). A transição da fase inflamatória para a fase de reparo é caracterizada pela invasão de fibroblastos e o aumento de colágeno no leito da ferida. A combinação destes eventos leva à formação de um tecido de granulação que proporciona uma barreira física à infecção, atua como superfície para a migração epitelial, além de ser uma fonte de miofibroblastos, que são de grande importância na contração da ferida, que também ocorre nesta fase (HUNT; HOPF, 1997; DOUGHTY; FAAN, 2005; DERNELL, 2006; FAHIE; SHETTKO, 2007; ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; PITZER; PATEL, 2011).

A última fase da cicatrização, a maturação, inicia-se uma vez que o colágeno é adequadamente depositado na ferida, perdurando por anos. A celularidade do tecido de granulação é reduzida e as fibras de colágeno tornam-se mais espessas, ocorrendo reorganização do tecido conectivo e rearranjo das fibras de colágeno, ocorrendo a substituição do colágeno tipo III pelo tipo I, que confere resistência de até 80% semelhante a do tecido original (HUNT; HOPF, 1997; DOUGHTY; FAAN, 2005; DERNELL, 2006; FAHIE; SHETTKO, 2007; ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; PITZER; PATEL, 2011).

### 2.3 Enxertos cutâneos

A enxertia cutânea consiste em um método de preenchimento cirúrgico de uma falha, onde não há tecido adjacente suficiente para sua cobertura, sendo que um segmento da epiderme e da derme é completamente removido da área doadora e transferido para o leito receptor (SWAIM, 1990; ANDREASSI et al., 2005).

O primeiro relato de enxertia cutânea é datado em 1869, quando um estudante de medicina aplicou com sucesso um enxerto epidérmico autógeno em um tecido de granulação (MCDOWELL, 1977). Desde então, diversos avanços tem sido feitos nesta técnica de cobertura cutânea por se tratar de um método prático, seguro e eficiente (MIRALIKBARI; MACKAY, 2006).

Os enxertos podem ser classificados de acordo com a sua relação entre o hospedeiro doador em: autógenos, alógenos ou xenógenos; e em relação a sua espessura: parcial ou total (SWAIM, 1990; PAVLETIC, 2007). Os enxertos autógenos são aqueles que o tecido doado e o receptor derivam do mesmo animal. São chamados de alógenos, ou hemoenxertos, aqueles que o receptor e o doador são de animais da mesma espécie. Os xenógenos, ou heteroenxertos, são os enxertos onde doador do tecido é de uma espécie diferente do receptor (PAVLETIC, 2007; PAVLETIC, 2010).

Clinicamente, a utilização de autoenxertos tem melhores resultados em comparação aos enxertos alógenos e xenógenos. Tal fato pode ser explicado pela menor estimulação imunogênica causada pelos enxertos autógenos em comparação aos outros dois tipos. Sendo assim, na maioria das vezes estes enxertos são utilizados de forma permanente, enquanto os enxertos xenógenos e alógenos são mais frequentemente aplicados como uma cobertura biológica temporária, pois tendem a ser rejeitados (CHIU; BURD, 2005; PAVLETIC, 2010; MACPHAIL, 2013).

O sucesso de um enxerto depende da sua espessura. Um enxerto de espessura total, ou dermoepidérmico, é composto por toda a epiderme e a derme. Já os enxertos parciais, ou laminares, também são compostos por epiderme, mas a porção da derme pode ser variável e assim são denominados como delgados, intermediários e espessos (ANDREASSI et al., 2005, PAVLETIC, 2007). Os enxertos de espessura parcial delgados são mais facilmente obtidos, mas proporcionam uma reparação pobre visto que a pele é fina, frágil e sujeita a retração pela ausência de componentes de derme. A qualidade de reparo proporcionada pelos enxertos laminares intermediários e espessos é maior, a pele é mais elástica e resistente, e as chances de retração são menores (STEPHENSON; GRIFFITHS; HAUSSE-BROWN, 2000). Os enxertos de espessura total são preferidos em pequenos animais, pois proporcionam, após a sua cicatrização, uma cobertura resistente e com função glandular e pilosa preservadas, não é necessário o uso de instrumental especializado, e, devido à abundância de pele dos locais doadores, é passível a realização de síntese direta (STANLEY et al., 2013).

Em Medicina Veterinária o uso de enxertos tem ampla aplicabilidade mediante a alta casuística de perda cutânea por traumatismos ou remoção de tumores, sendo

particularmente indicada em lesões de extremidades, onde a imobilidade cutânea impede a elaboração de retalhos locais (TONG; SIMPSON, 2012).

A aplicação dessa técnica requer seleção adequada do paciente, visto que aqueles debilitados ou portadores de doença crônica são predispostos a infecções, o que põe em risco a prática de enxertia. Em relação ao paciente, é desejável que sejam previamente corrigidos distúrbios anêmicos e lipoproteicos, e que estes possuam comportamento que favoreça o fácil manejo no pós-operatório (MIRALIAKBARI; MACKAY, 2006).

O leito da ferida deve ser capaz de fornecer a vasculatura necessária para manter a sobrevivência do enxerto. Para que uma ferida crônica, infectada e mal perfundida se torne hábil à um processo de enxertia, é necessário o preparo do seu leito, o que envolve lavagem, debridamento, trocas frequentes de curativo até a formação de tecido de granulação saudável (MIRALIAKBARI; MACKAY, 2006). Enxertos podem ser aplicados em locais denominados frescos, ou seja, onde ainda não houve cobertura por tecido de granulação (TANNER; VANDEPUT; OLLEY, 1964; TONG; SIMPSON, 2012). Entretanto, esses locais devem ser vascularizados o suficiente e livres de infecção para proporcionar a sobrevivência do enxerto (TONG; SIMPSON, 2012). Os enxertos não terão sucesso na aplicação em feridas infectadas, tecidos submetidos à radiação, tecido adiposo avascular, tecido de granulação frágil e em superfícies compostas de tecido escamoso estratificado e mesenquimal como ossos, cartilagem, tendões e nervos (SWAIM, 1987; SWAIM, 1990; PAVLETIC, 2007).

A degeneração do enxerto de pele tem início logo após a remoção do leito doador, e sua regeneração logo após o depósito no leito receptor. Neste momento inicial, estes dois fenômenos ocorrem simultaneamente, sendo a regeneração mais lenta que a degeneração. Somente no 7° a 8° dia do pós-operatório esses eventos se contrapõem e a regeneração passa a ser definitivamente predominante (TANNER; VANDEPUT; OLLEY, 1964 ; BIRCH; BRÅRNEMARK, 1969; PAVLETIC, 2007).

O enxerto passa por quatro fases até a sua cicatrização: aderência, embebição plasmática, inosculação e neoangiogênese (KUNERT, 1991; HIERNER et al., 2005). A aderência ocorre logo após a aplicação do enxerto, onde uma rede

de fibrina adere o enxerto ao seu leito, ocorrendo retração dos filamentos de fibrina tracionando o enxerto até que ocorra íntimo contato ao leito doador. A rede de fibrina é convertida em tecido fibroso entre o enxerto e o leito, por meio da invasão de fibroblastos, leucócitos e fagócitos. Este tecido inicia sua resistência e proporciona força na aderência, a partir de 8 horas da sua aplicação até o décimo dia pós-operatório (CHICK, 1988; HIERNER et al., 2005).

A fase de embebição plasmática corresponde ao espasmo vascular das bordas seccionadas do enxerto no momento de sua retirada do local doador, e eliminação de soro isento de fibrinogênio e composto por eritrócitos, leucócitos e polimorfonucleares, pelas bordas do leito receptor. Este líquido acumula-se no leito da ferida e é absorvido pelo enxerto por meio de ação capilar após vasodilatação iniciada no momento da aplicação. Este líquido irá nutrir o enxerto e causar edema que atinge seu ponto máximo por volta de 48 a 72 horas. Neste momento a circulação é reestabelecida (CHICK, 1988; PAVLETIC, 2007; ANDREASSI et al., 2005; HIERNER et al., 2005).

A inosculação refere-se à anastomose dos vasos enxertados com os vasos do leito receptor, adquirido aproximadamente o mesmo diâmetro entre eles com seu início em até 22 horas após a aplicação do enxerto, porém é evidente em 48 a 72 horas. A rede de fibrina também é importante para este fenômeno visto que serve de sustentação para o brotamento desses vasos. Concomitantemente ocorre a formação de novos vasos. A fase de neoangiogênese revasculariza o enxerto por meio de crescimento de vasos invadindo a derme. Os vasos que antes estavam envolvidos na inosculação degeneram e inicia-se a maturação dos neovasos (SWAIN, 1987; CHICK, 1988; KUNERT, 1991).

Do ponto de vista clínico, o enxerto é inicialmente pálido e naturalmente evolui para uma cor cianótica. A partir do momento em que assume coloração rosada confirma-se o sucesso da enxertia (ANDREASSI et al., 2005).

Após a aplicação do enxerto, deve se atentar para a técnica de bandagem a ser aplicada, assim como a frequência de trocas que variam conforme a técnica escolhida. Normalmente a primeira troca de curativo não ocorre antes de 48 a 72 horas, para que o enxerto fique imóvel. As trocas dos curativos devem ser muito delicadas, pois as principais causas de insucesso na técnica estão ligadas a

separação do enxerto a partir do leito, movimentação do enxerto e infecção (MIRALIAKBARI; MACKAY, 2006; STANLEY et al., 2013).

## 2.4 Membranas biológicas

Membranas biológicas consistem em materiais de natureza orgânica, constituídos quase que por sua totalidade de colágeno. São inertes e de baixa toxicidade, o que permite ampla utilização, tanto na Medicina como na Medicina Veterinária. Como exemplos de materiais usados como membranas biológicas podemos citar a membrana amniótica, cartilagem, mucosa intestinal, e pele entre outros (MAY, 1991).

A aplicação das membranas biológicas em feridas abertas causa conforto ao paciente, estímulo à epitelização, síntese de colágeno e o aumento da contração da ferida. Estes materiais também tem grande aplicabilidade na reconstrução cirúrgica de estruturas corporais, pois proporcionam boa resistência, facilidade na aplicação além de serem inertes (LIPTAK, 1997; OVINGTON, 2007).

Curativos biológicos auxiliam na cicatrização de feridas retardando a formação de tecido de granulação exuberante, fornecendo e mantendo ambiente úmido que favorece a regeneração e migração de células epiteliais, e, agindo como barreira física para a proteção da ferida contra infecção. Estes curativos também podem induzir resposta inflamatória leve, o que tem sido relatada como efeito benéfico sobre a cicatrização (GOMEZ et al., 2004).

### 2.4.1 Membrana amniótica

A membrana amniótica, ou âmnion, é uma fina membrana localizada na parte mais interna da placenta que envolve por completo o feto. O espaço entre o feto e a placenta é preenchido por líquido amniótico formando assim a cavidade amniótica (MAMEDE et al., 2012).

Diversos estudos em humanos tem sido realizados sobre a sua utilização, devido as suas propriedades funcionais e estruturais. Suas primeiras aplicações clínicas datam da década de 1910 em transplantes cutâneos e no tratamento de

feridas por queimaduras (DAVIS, 1910). Desde então, este material passou a ser considerado uma opção de tratamento interessante para processos patológicos associadas ao trato geniturinário, cavidade oral, reconstrução ocular, pele, estômago, laringe, cabeça e pescoço (DUA, 1999; MAMEDE et al., 2012). O âmnion também tem sido utilizado para a prevenção de aderências iatrogênicas em cirurgias abdominais, pélvicas e de cabeça (ARORA, et al., 1994; DUA, 1999). Entretanto o seu uso entrou em declínio durante décadas até a sua reintrodução recente em cirurgias oftálmicas e humanos (DUA, 1999; DUA et al., 2004).

A membrana amniótica é um material atraente para o uso na prática clínica, por ser de fácil obtenção e preservação, aplicação cirúrgica prática e de baixo custo. Todo o seu processo de obtenção deve ser de forma estéril após cesariana eletiva de doadores comprovadamente hígidos (DUA, 1999; MAMEDE et al., 2012). Os métodos de preservação para este material incluem a glicerina, o glutaraldeído, solução de açúcar ou sal supersaturada, solução de polivinilpirrolidona e congelamento. O meio ideal para conservação deve manter a integridade tecidual, atenuar a ação antigênica, aumentar a resistência à tração e atuar por um longo período, mantendo a assepsia do material, devendo ser sendo ainda de baixo custo e fácil manuseio (OLIVEIRA et al., 2009).

O âmnion é uma membrana translúcida composta por uma camada interna de células epiteliais, conectadas à membrana basal, que por sua vez está ligada a uma fina camada de tecido conjuntivo por fios filamentosos (DUA et al., 2004).

O desenvolvimento fetal é alcançado por meio de um sistema complexo formado pelo cordão umbilical, líquido amniótico e a placenta. As membranas fetais são compostas de duas camadas: uma camada externa (córion), que fica em contato com as células maternas, e uma camada interna (membrana amniótica) (MAMEDE et al., 2012).

Após a implantação do blastocisto no endométrio, as sua paredes passam por transformações e dão origem ao córion. Ao mesmo tempo, as células embrionárias e células trofoblásticas dão origem à membrana amniótica. A membrana não possui nervos, músculos ou vasos linfáticos. Sua fonte de nutrientes e oxigênio se dá por difusão através do fluido amniótico coriônico e os vasos superficiais do feto (SCURRY, 2002).

O âmnion pode ser histologicamente dividido em três camadas, a primeira mais interna é o epitélio, seguido pela membrana basal e a camada mesenquimal avascular, a mais externa (BOURNE, 1960). Em conjunto, estas estruturas possuem funções metabólicas múltiplas, como o transporte de água e materiais solúveis, produção de fatores bioativos como peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas. Uma das funções básicas da membrana amniótica é proporcionar ao embrião em desenvolvimento uma proteção contra dessecação e um ambiente de suspensão, no qual o embrião pode se desenvolver livre de pressões das estruturas que cercam seu corpo (MAMEDE et al., 2012).

#### 2.4.1.1 Propriedades relevantes

A membrana amniótica possui propriedades diversas, o que justifica a sua ampla aplicabilidade. Suas células possuem ações pluripotentes, podendo expressar genes de células como hepatócitos, cardiomiócitos, condrócitos, neurócitos, células beta pancreáticas, entre outras (TODA et al., 2007; MAMEDE et al., 2012)

Apesar de mecanismos ainda não conhecidos, a membrana amniótica possui efeitos antiinflamatórios, antibacterianos e antivirais com baixo potencial imunogênico. Além disso, este biomaterial pode apresentar características anti-angiogênicas e pró-apoptóticas, estimular a epitelização sem pontencial carcinogênico. Algumas dessas funções são selecionadas de acordo com o lado, mesenquimal ou epitelial, a qual a membrana é aplicada (TODA et al., 2007; NIKNEJAD et al., 2013).

A membrana amniótica possui características únicas quando aplicadas na pele e inclui efeitos anti-adesivos, ação bacteriostática, proteção de feridas, redução da dor e alta capacidade de estimular a epitelização. Sua utilização estende-se à aplicação em feridas abertas como úlceras de decúbito e feridas crônicas; ferida por queimaduras até cirurgias reconstrutivas e oncológicas (SUBRAHMANYAM, 1995; MELLER et al., 2000; LOFÊGO FILHO et al., 2006; MOHAMMADI et al., 2013).

## 2.5 Fototerapia

O interesse clínico na aplicação da fototerapia aumentou nas últimas décadas, embora a ideia da utilização terapêutica da luz não seja recente. Antes de 1960 não houve nenhum sucesso no aproveitamento da luz na formação do laser (WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009). Maiman (1960) foi o primeiro a relatar a formação do laser a partir da radiação, desde então inúmeros estudos foram desenvolvidos para controlar a produção de luz para alcançar efeito terapêutico ótimo para a aplicação na Medicina (WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009).

O *laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é um dos recursos fototerapêuticos mais utilizados e possui propriedades únicas como monocromaticidade (comprimento de onda único), colimação (transmitido em uma única direção, sem divergência) e coerência (todas as ondas em fase) (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005).

A luz emitida pelo laser pode ser classificada dentro do espectro eletromagnético por meio do comprimento da onda e sua potência de emissão. Existem vários tipos de ondas, entretanto todas possuem a mesma natureza, ou seja, são constituídas de campos elétricos e magnéticos (AGNE, 2013). Os vários tipos de ondas possuem comprimento de onda diferentes (distância entre dois picos da onda) e esta apresenta relação inversa com a frequência com a qual ela será emitida, ou seja, quanto maior o comprimento da onda menor a frequência, sendo o inverso também verdadeiro (TUNER; HODE, 2010; AGNE, 2013).

O comprimento de onda pode ser mensurado em nanômetros (nm), e a luz visível varia de 400 nm a 700 nm e a luz não visível acima de 700 nm (infravermelho) Estas variação é conhecida como janela terapêutica, portanto a escolha da luz que será utilizada para determinado fim é baseada no valor do seu comprimento de onda, que por sua vez será escolhido de acordo com o tipo de célula ou tecido que irá absorvê-lo. O laser ainda pode ser classificado baseando-se em sua potência de emissão, que está diretamente correlacionado com o efeito tecidual que se deseja produzir. Sendo assim, o laser pode ser classificado em três categorias, alta, média e baixa potência (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; TUNER; HODE, 2010; AGNE, 2013).

A Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI), ou baixa potência, vem se tornando uma opção terapêutica frequente na Medicina, tais como no tratamento de

artrites, lesões lombares, traumas cutâneos e lesões de tecidos moles em geral (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005). As propriedades citadas anteriormente permitem a penetração da luz na superfície do tecido de forma não invasiva (MATIĆ et al., 2002). Embora a maioria dos mecanismos da ação dos lasers sobre a pele sejam mediados por meio de efeitos fototérmicos, a LBI geralmente provoca baixas temperaturas ou mudanças de temperaturas imperceptíveis no tecido alvo, o que dá origem ao termo de baixa intensidade ou laser frio (CORAZZA et al., 2007).

O efeito celular causado pela fototerapia pode ser classificado em três categorias: primária, secundária e terciária (DYSON, 2006). A reação primária é designada e restrita à absorção dos fótons. Estes atingem a mitocôndria e a membrana celular dos fibroblastos, queratinócitos ou de células endoteliais, sendo absorvidos pelos cromóforos (moléculas do tecido capazes de absorver radiação luminosa). Neste momento os fótons emitidos são convertidos em energia cinética química dentro da célula provocando alterações na permeabilidade da membrana celular, melhoria na sinalização entre as mitocôndrias, núcleo e citosol, formação de óxido nítrico e aumento do metabolismo oxidativo para a produção de ATP (adenosina trifosfato). Os resultados da reação primária compreendem na normalização da função celular, causando efeitos clínicos como alívio da dor e cicatrização de feridas (DYSON, 2006; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005).

As reações secundárias são amplificações das reações primárias. O cálcio é liberado da mitocôndria para o citoplasma, aumentando assim os níveis de cálcio intracelular. Este fenômeno irá estimular o metabolismo celular e a regulação das vias de sinalização responsáveis por estímulo na migração celular, síntese de DNA (*desoxyribonucleic acid*) e RNA (*ribonucleic acid*), mitose celular, secreção de proteínas e proliferação celular. Os mecanismos envolvidos nas reações secundárias não são oriundos exclusivamente da fototerapia, mas são dependentes da sensibilidade da célula que recebeu o *laser* (DYSON, 2006; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005).

Os efeitos terciários são considerados menos previsíveis, pois sua resposta é multifatorial, dependendo da influência do ambiente externo e interno, e das interações intracelulares. Por meio do aumento dos níveis de citocinas e fatores de

crescimento, as células que foram irradiadas estabelecem comunicação intercelular com as células que não foram atingidas pelos fótons. Conseqüentemente, ocorre aumento da resposta imune, representado pela ativação de linfócitos T, macrófagos e mastócitos. Há também a síntese de endorfinas e decréscimo dos níveis de bradicinina, que estão ligados à diminuição da dor. Portanto, as reações terciárias refletem envolvimento sistêmico da terapia, o que justifica o estímulo de cicatrização de uma lesão que não está sendo diretamente tratada (DYSON, 2006; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005).

### 2.5.1 Aplicação clínica do LBI

Embora existam evidências de benefícios com o uso da LBI na Medicina Humana, alguns estudos divergem destes achados com resultados negativos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005). Entretanto, a maioria dos ensaios de aplicação clínica não apresentaram resultados negativos. Um estudo realizado em um hospital humano na Inglaterra fez uso da laserterapia no pós-cirúrgico e os pacientes relataram diminuição significativa da dor, redução de 50% do uso de analgésicos, redução do tempo de cicatrização e da formação de cicatriz (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005). Trelles e colaboradores (1989) estudaram o uso de irradiação local com fototerapia e encontraram os seguintes efeitos: analgesia, efeitos antiexsudativos, anti-hemorrágicos, antiinflamatórios, antiedematosos, antiespasmóticos e vasodilatadores.

Clinicamente, a LBI possui efeitos como a redução da dor de grande variedade de perturbações neurológicas agudas e entidades de dor crônica, incluindo dores relacionadas com anormalidades nos tecidos nervosos, tecidos moles, músculos, tendões, articulações e ossos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005). Também foi observada a diminuição do edema e inflamação associada com lesões agudas em músculos superficiais, tendões, ligamentos, bursas e bainhas (WOODRUFF et al., 2004). Melhora a cicatrização de feridas de evolução lenta ou retardada, tanto em tecidos moles como em tendões e ossos, devido à melhora da oxigenação tecidual (KUBOTA, 2004; WOODRUFF et al., 2004).

A LBI também já foi utilizada com sucesso em humanos, no auxílio de tratamentos como Doença de Raynaud, Doença Buerger e úlceras de decúbito, devido a melhora na circulação sanguínea local e sistêmica (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005). Além disso, a LBI pode melhorar a resposta imune em doenças imunomoduladas tais como a psoríase, artrite reumatoide e dermatite atópica (WOODRUFF et al., 2004). A hipertensão sistêmica também pode melhorar com o uso da LBI, pelo aumento da taxa de fluxo do diâmetro dos vasos. Por fim, esteticamente a LBI pode ser aplicada de diversas formas, principalmente na restauração do pigmento normal de lesões cutâneas (GABEL, 1995).

Os lasers têm revelado uma variedade de aplicações na Medicina Veterinária. Além do estímulo na cicatrização de feridas, o uso dessa terapia na reabilitação dos pacientes é bastante útil, devido aos seus benefícios como o alívio da dor e a diminuição do edema. O laser também possui a vantagem de poder ser combinado de forma segura e eficaz com outras modalidades terapêuticas, proporcionando resultados de forma integrada. Em animais, o *laser* também tem sido utilizado para estímulos de pontos de acupuntura, como alternativa das agulhas, pois é menos invasivo, mais seguro e de fácil aplicação (BAXTER; MCDONOUGH, 2007).

#### 2.5.2. Interação do LBI no processo cicatricial

A LBI age nas três principais fases do processo de cicatrização, trazendo benefícios específicos para cada um deles. Na fase inflamatória ocorre uma modulação celular responsável pela diminuição de células inflamatórias e aumento de fatores de crescimento, o que permite migração mais rápida para a fase proliferativa, acelerando assim todo o processo. Na próxima fase, a proliferativa, a neovascularização é enriquecida pela fotoestimulação das células endoteliais, aumento da proliferação de fibroblastos e depósito de colágeno. Todos esses fatores contribuem para a formação do tecido de granulação e para a contração da ferida. Na terceira e última fase, ocorre o remodelamento do tecido onde a LBI induziu a neovascularização e deposição de colágeno, que neste momento passa a ter orientação e maturidade (POSTEN et al., 2005; CORAZZA et al., 2007).

Diversos estudos foram realizados para melhorar a compreensão dos efeitos de LBI a nível celular, uma vez que relatou-se melhoria do processo cicatricial mediado pelo laser. Com isso, as pesquisas mais recentes foram direcionadas para a análise do impacto do laser sobre as células envolvidas no reparo de feridas (ROCHA, 2004; CORAZZA et al., 2007; WHINFIELD; AITKENHEAD, 2009; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010).

Investigações sobre os mecanismos envolvidos na cicatrização mostraram a interação da terapia LBI com diversos tipos celulares, trazendo benefícios terapêuticos tanto *in vivo* como *in vitro* (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005). Os mastócitos e macrófagos estimulados liberam fatores de crescimento e outras substâncias. Além disso, ocorre também a estimulação da proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (STEINLECHNER; DYSON, 1993; HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005). O desenvolvimento de tecido de granulação é controlado principalmente por fatores de crescimento liberados pelos macrófagos (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005).

## Referências

ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (Oxford)**. v.29(10), p. 491-495, 2011.

AGNE, J. E. Fototerapia. In:\_\_\_\_\_ **Eletrotermofototerapia**.1. ed. Santa Maria, 2013. p. 357-384.

ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 332-337, 2005.

ARORA, M.; JAROUDI, K. A.; HAMILTON, C. J.; DAYEL, F. Controlled comparison of interceed and amniotic membrane graft in the prevention of postoperative adhesions in the rabbit uterine horn model. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, France, v. 55, n. 3, p. 179-182, 1994.

BAUER, M.S.; AIKEN, S. The healing of open wounds. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**. v.4(4), p. 268-273, 1989.

BAXTER, G. D.; MCDONOUGH, S. M. Principles of electrotherapy in veterinary physiotherapy. In: MCGOWAN, C. M.; GOFF, L.; STUBBS, N. **Animal Physiotherapy: assessment, treatment and rehabilitation of animals**. 1. ed. Reino Unido, 2007, cap. 10, p. 177-186.

BIRCH, J.; BRÅRNEMARK, P. I. The vascularization of a free full thickness skin graft: I. A vital microscopic study. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, Sweden, v. 3, n. 1, p. 1-10, 1969.

BOURNE, G. L. The microscopic anatomy of the human âmnion and chorion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 79, p. 1070, 1960.

CAMPBELL, K. L.; LICHTENSTEIGER, C. A. Structure and function of the skin. In: CAMPBELL, K. L. **Small animal dermatology secrets**.1. ed. Chile, 2004, cap. 1, p. 1-9.

CHICK, L. R. B.. History and biology of skin grafting. **Annals of Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 358-365, 1988.

CHIU, T.; BURD, A. "Xenograft" dressing in the treatment of burns. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 419-423, 2005.

CORAZZA, A. V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, New York, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

DAVIS, J. S. Skin transplantation. **Johns Hopkins Hospital Reports**, Maryland, v. 15, p. 307-96, 1910.

DERNELL, W.S. Initial wound management. **Vet Clin Small Anim**. v.36(1), p. 713-738, 2006.

DOUGHTY, D.; FAAN, C. Dressings and more: Guidelines for topical wound management. **Nurs Clin N Am.** v.40(1), p. 217-231, 2005.

DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 83, n. 6, p. 748-752, 1999.

DUA, H. S.; GOMES, J. A.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V. S. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, Plymouth, v. 49, n. 1, p. 51-77, 2004.

DYSON, M. Primary, secondary and tertiary effects of phototherapy: a review. **Proceedings of SPIE.** v. 6140, p. 61-72, 2006.

FAHIE, M.A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: A systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. **Vet Clin Small Anim.** v.37(1), p. 559-577, 2007

FONDER, M.A.; LAZARUS, G.S.; COWAN, D.A.; ARONSON-COOK, B.; KOHLI, A.R. ; MAMELAK A.J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J Am Acad Dermatol.** v.58(2), p. 185-206, 2008.

FOWLER, D. Distal limb and paw injuries. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, p. 819–845, 2006.

GABEL, P. Does laser enhance bruising in acute sporting injuries? **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 41, p. 273-278, 1995.

GOMEZ, J. H.; SCHUMACHER, J.; LAUTEN, S. D.; SARTIN, E. A.; HATHCOCK, T. L.; SWAIM, S. F. Effects of 3 biologic dressings on healing of cutaneous wounds on the limbs of horses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 49, 2004.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 3, p. 251-259, 2005.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, n. 1, p. 486-493, 2005.

HIERNER, R.; DEGREEF, H.; VRANCKX, J. J.; GARMYN, M.; MASSAGÉ, P.; VAN BRUSSEL, M. Skin grafting and wound healing the "dermato-plastic team approach". **Clinics in Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 343-352, 2005.

HUNT, T.K.; HOPF, H.W. Wound healing and wound infection: What surgeons and anesthesiologists can do. **Surgical Clinics Of North America**. v.77(3), p. 587-606, 1997.

KUBOTA, J. Defocused diode laser therapy (830 nm) in the treatment of unresponsive skin ulcer: a preliminary trial. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 6, n.2, p. 96-102, 2004.

KUNERT, P. Structure and construction: the system of skin flaps. **Annals of Plastic Surgery**, v. 27, n. 6, p. 509-518, 1991.

LIPTAK, J. M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 408-413, 1997.

LOFÊGO FILHO, J. A.; DADALTI, P.; SOUZA, D. C. D.; SOUZA, P. R. C. D.; SILVA, M. A. L. D.; TAKIYA, C. M. Skin grafts in cutaneous oncology. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 465-472, 2006.

MACPHAIL, C. M. Wound management. In: FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery**. 4. ed. St. Louis, 2013. cap. 16, p. 190-207.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, 493-494, 1960.

MAMEDE, A. C.; CARVALHO, M. J.; ABRANTES, A. M.; LARANJO, M.; MAIA, C. J.; BOTELHO, M. F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 447-458, 2012.

MATIĆ, M.; LAZETIĆ, B.; POLJACKI, M.; DURAN, V.; IVKOV-SIMIĆ, M. Low level laser irradiation and its effect on repair processes in the skin. **Medicinski Pregled**, v. 56, n. 4, p. 137-141, 2002.

MAY, S. R. The effects of biological wound dressings on the healing process. **Clinical Materials**, v. 8, n. 3, p. 243-249, 1991.

MCDOWELL F. The Source Book of Plastic Surgery. **Baltimore: Williams and Wilkins**, p 1-52, 1977.

MELLER, D.; PIRES, R. T.; MACK, R. J.; FIGUEIREDO, F.; HEILIGENHAUS, A.; PARK, W. C.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. **Ophthalmology**, v. 107, n. 5, p. 980-989, 2000.

MIRALIAKBARI, R.; MACKAY, D. R. Skin grafts. **Operative Techniques in General Surgery**, v. 8, n. 4, p. 197-206, 2006.

MOHAMMADI, A. A.; SEYED, J. S. M.; KIASAT, M.; TAVAKKOLIAN, A. R.; IMANI, M. T.; AYAZ, M.; TOLIDE-IE, H. R. Effect of fresh human amniotic membrane dressing on graft take in patients with chronic burn wounds compared with conventional methods. **Burns**, v. 39, n. 2, p. 349-353, 2013.

MULLER, G. H.; MILLER, J.; GRIFFIN, C. E. Structure and function of the skin. In:\_\_\_\_\_. 6. ed. **Small animal dermatology**. Philadelphia, 2001. cap. 1, p. 1-70.

NIKNEJAD, H.; PAEINI-VAYGHAN, G.; TEHRANI, F. A.; KHAYAT-KHOEI, M.; PEIROVI, H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta**, v. 34, n. 4, p. 340-345, 2013.

OLIVEIRA, L.; SOUZA, D.; ABÍLIO, E.; CARVALHO, E. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 2, n. 3, p. 175-188, 2009.

OVINGTON, L. G. Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 33-38, 2007.

PATERSON, S. Introduction – structure and function. In:\_\_\_\_\_. 2. ed. **Manual of skin diseases of the dog and cat**. Oxford, 2008. cap. 1, p. 1-8.

PAVLETIC, M. M. Tegumento. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri, 2007. cap. 20, p. 250-258.

PAVLETIC, M. M. The skin. In:\_\_\_\_\_. 4. ed. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. Iowa, 2010. cap. 1, p. 4-17.

PAVLETIC, M. M. Vascular supply to the skin of the dog: A review. **Veterinary Surgery**, v. 9, n. 2, p. 77-80, 1980.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, Tzu-Yun; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 3, p. 291-325, 2010.

PITZER, G.B.; PATEL, K.G. Proper care of early wounds to optimize healing and prevent complications. **Facial Plast Surg Clin N Am**. v.19(1), p. 491-504, 2011.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 334-340, 2005.

ROCHA, J. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2004.

SCURRY, J. Pathology of the human placenta. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 42, n. 3, p. 315-315, 2002.

STANLEY, B. J.; PITT, K. A.; WEDER, C. D.; FRITZ, M. C.; HAUPTMAN, J. G.; STEFICEK, B. A. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 5, p. 511-522, 2013.

STEINLECHNER, C. W. B.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v. 5, n. 2, p. 65-73, 1993.

STEPHENSON, A. J.; GRIFFITHS, R. W.; HAUSSE-BROWN, T. L. Patterns of contraction in human full thickness skin grafts. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 53, n. 5, p. 397-402, 2000.

SUBRAHMANYAMAM, M. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 7, p. 477-478, 1995.

SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clinics in Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 403-412, 2005.

SWAIM, S. F. Basic principles for reconstruction of problem skin defects on the limbs and feet. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 112, p. 48-55, 1987.

SWAIM, S. F. Skin grafts. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 147-175, 1990.

TANNER, J. C.; VANDEPUT, J.; OLLEY, J. F. The mesh skin graft. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 34, n. 3, p. 287-292, 1964.

TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/âmnion-derived cells for regeneration of various tissues. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 105, n. 3, p. 215, 2007.

TONG, T.; SIMPSON, D. J. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 9, p. 520-525, 2012.

TRELLES M. A.; MAYAYO E.; MIRO L.; RIGAU, J.; BAUDIN, G.; CALDERHEAD, R. G. The action of low reactive Level Laser Therapy (LLLT) on mast cells: a possible relief mechanism examined. **Laser Therapy**. v. 1, p. 27 -30, 1989.

TUNER J., HODE L. Therapeutic lasers. In:\_\_\_\_\_. **The new laser therapy handbook**. 1. ed. New York, 2010. cap.1, p. 43-48.

WHINFIELD, A. L.; AITKENHEAD, I. The light revival: does phototherapy promote wound healing? A review. **The Foot**, v. 19, n. 2, p. 117-124, 2009.

WILLIAMS, J. M.; FOWLER, D. Wound management and reconstruction. In:\_\_\_\_\_. 1. ed. **Manual of canine and feline wound management and reconstruction**. Cheltenham, 1999. cap. 1, p. 1-4.

WOODRUFF, L.; BOUNKEO, J.; BRANNON, W.; DAWES, K.; BARHAM, C.; WADDELL, D.; ENWEMEKA, C. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22(3), p. 241-247, 2004.

## CAPÍTULO 2 – Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia

Nazilton P. Reis Filho<sup>2\*</sup>, Marília G.P.A. Ferreira<sup>2</sup>, Ana L.C.R. Pascoli<sup>2</sup>, Rafaela B. Viéra<sup>3</sup>, Josiane M. Pazzini<sup>2</sup>, Rafael V.P. de Oliveira<sup>3</sup>, Igor L.S. Senhorello<sup>2</sup>, Paloma E.S. Silva<sup>2</sup>, Rosemeri O. Vasconcelos<sup>3</sup>, Antonio S. Ferraudo<sup>2</sup>, Andriago B. De Nardi<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Reis Filho N.P., Ferreira M.G.P.A., Pascoli A.L.C.R., Viéra R.B., Pazzini J.M., Oliveira R.V.P., Senhorello I.L.S., Silva P.E.S., Vasconcelos R.O., Ferraudo A.S. & De Nardi A.B. 2015. **[Skin graft epithelialization in rabbit fresh wounds treated with amniotic membrane and/or laser therapy.]** Comparação entre a membrana amniótica canina e a laserterapia na estimulação de epitelização de enxertos cutâneos em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 - Jaboticabal, SP, Brazil. E-mail: [nazilton@hotmail.com](mailto:nazilton@hotmail.com)

Skin grafting is a simple surgical technique and useful to repair wounds, especially those where there is a difficulty to apply primary closure skin or other reconstructive techniques. However, for the graft survival it is necessary that the healthy wound bed and the presence of an exuberant granulation tissue. This study aimed to evaluate the application of amniotic membrane and laser therapy as potential stimulating healing in grafts applied in wounds without granulation tissue. For this, we used 42 rabbits divided into four treatment groups, control group (CG), membrane group (MG), laser group (LG) and membrane and laser group (MLG), submitted to macroscopic and microscopic evaluation. The macroscopic examination was possible to note that the patients of the groups where the amniotic membrane was used in order to stimulate re-epithelialization (MG and MLG) presented evidences associated with severe inflammatory reaction, graft integration failure and consequent necrosis. In LG patients apparently had the best aspect of the graft in the last valuation date. On the microscopic examination, there was intense integration of the graft to the dermis, high reepithelialization level and scarce inflammatory cells in the graft site of LG group patients. The opposite was observed in patients in the MG and MLG groups, where apparently the presence of amniotic membrane seems to have induced very consistent inflammatory response in the region adjacent to the membrane and the graft, evincing that there was a rejection of the membrane. Finally, the collagen formation does not correlated with other factors such as inflammation and necrosis in any of the treatment groups. We can conclude that laser therapy was effective, contributing to the healing process and integration of the graft. Thus, the canine amniotic membrane should not be used for this purpose because it causes intense inflammatory reaction besides to avoid graft nutrition.

INDEX TERMS - amniotic membrane, epithelialization, laser therapy, skin grafts

**RESUMO.-** A enxertia cutânea é uma técnica cirúrgica simples e bastante útil para o reparo de feridas, principalmente aquelas onde existe dificuldade da aplicação do fechamento primário ou de outras técnicas reconstrutivas. Entretanto, para a sobrevivência do enxerto, é necessário que o leito da ferida esteja saudável e com presença de tecido de granulação exuberante. O objetivo do trabalho objetivou avaliar a aplicação da membrana amniótica e da laserterapia como potenciais estimulantes da cicatrização em enxertos aplicados em feridas sem tecido de granulação. Para isso, foram utilizados 42 coelhos divididos em quatro grupos de tratamento, grupo controle (GC), grupo membrana (GM), grupo laser (GL) e grupo membrana e laser (GML), submetidos a avaliações macro e microscópicas. Na avaliação macroscópica foi possível notar que os pacientes dos grupos nos quais a membrana amniótica foi utilizada com o intuito de estimular a reepitelização (GM e GML) apresentaram evidências associadas a acentuada reação inflamatória, falha de integração do enxerto e consequente necrose do mesmo. Já os pacientes do grupo GL apresentaram melhor aspecto do enxerto no último dia de avaliação. Na análise microscópica, observou-se intensa integração do enxerto à derme, reepitelização acentuada e escassas células inflamatórias no local do enxerto nos pacientes do grupo GL. O contrário foi observado nos pacientes dos grupos GM e GML, nos quais aparentemente a presença da membrana amniótica induziu resposta inflamatória bastante

1Recebido em ...

Aceito para publicação em...

2Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 - Jaboticabal, SP, Brasil. Pesquisa de mestrado com apoio CAPES. \*Autor para correspondência: [nazilton@hotmail.com](mailto:nazilton@hotmail.com).

3Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 - Jaboticabal, SP, Brasil.

consistente na região adjacente à membrana e ao enxerto, resultando em rejeição da membrana. Por último, a formação de colágeno não se correlaciona com outros fatores como inflamação e necrose, em nenhum dos grupos de tratamento. Desta forma, é possível afirmar que a laserterapia mostrou ser efetiva, contribuindo para o processo cicatricial e integração do enxerto. Já a membrana amniótica canina não deve ser utilizada para este fim, pois provoca intensa reação inflamatória além de impedir a nutrição do enxerto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: epitelização, enxerto cutâneo, laserterapia, membrana amniótica

## INTRODUÇÃO

A técnica de enxertia cutânea é uma das maneiras mais simples de cobrir um defeito superficial de pele. Consiste basicamente na transferência de uma porção de pele de espessura variável, que é removida completamente de seu local de origem e transferida para a área receptora (Andreassi et al. 2005). O intuito da aplicação do enxerto de pele é reestabelecer a barreira cutânea, sobretudo em defeitos que não podem ser reconstituídos por justaposição direta ou por retalho de pele, devido a sua localização (Fowler 2006).

Embora amplamente utilizada em Medicina, a enxertia cutânea tem seu uso limitado em animais domésticos, pois é necessário que a ferida apresente leito com tecido de granulação saudável, ausência de tecido necrótico, infecção e corpos estranhos para que se alcance o resultado esperado (Fowler 2006). Em muitos casos, até que se obtenha o ambiente desejável para a aplicação do enxerto, é necessário o preparo da ferida para induzir a cicatrização por segunda intenção, o que requer grande disponibilidade e cuidado por parte do proprietário além de onerar o tratamento. Portanto, estes fatores podem contribuir para a diminuição da indicação da técnica (Miraliakbari & Mackay 2006, Tong & Simpson, 2012).

Tanto a membrana amniótica como a laserterapia são recursos utilizados em Medicina com diversas finalidades, entre elas a contribuição no processo de cicatrização de feridas. A membrana amniótica possui características únicas quando aplicadas na pele e inclui efeitos antiadesivos, ação bacteriostática, proteção de feridas, redução da dor e alta capacidade de estimular a epitelização. É utilizada em feridas abertas como úlceras de decúbito e feridas crônicas; ferida por queimaduras até cirurgias reconstrutivas e oncológicas (Subrahmanyam 1995, Meller et al. 2000, Lofêgo Filho et al. 2006, Mohammadi et al. 2013). Já o uso do Laser de Baixa Intensidade (LBI) contribui em todas as fases do processo de cicatrização, agindo de forma diferente em cada uma delas, produzindo efeitos benéficos como bioestimulação, analgesia, efeitos antiexsudativos, anti-hemorrágicos, antiinflamatórios, antiedematosos, antiespasmóticos e vasodilatadores (Trelles et al. 1989, Posten et al. 2005, Corazza et al. 2007).

Visando a problemática exposta, este trabalho teve por objetivo comparar o emprego da membrana amniótica canina e da fototerapia pelo uso de LBI, como potenciais estimulantes da cicatrização em enxertos cutâneos aplicados em feridas recém criadas em coelhos, com o intuito de proporcionar um processo cicatricial mais eficiente e ampliar a aplicabilidade da técnica em casos onde o leito da ferida é pobre em fornecer boa nutrição ao enxerto.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, sendo realizada segundo os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCAV) sob o protocolo número 018677/14.

**Seleção do doador da membrana amniótica.** Foram coletas membranas amnióticas provenientes de cesariana de um único cão, fêmea, saudável, múltipara, com gestação de aproximadamente 60 dias, e que não apresentava sinais de distocia de origem materna. Como critérios para avaliação da higidez do paciente foram levados em consideração o histórico, a avaliação física e os exames hematológicos pré-operatórios. A avaliação desses parâmetros não permitiu a identificação de qualquer evidência de doença concomitante ou antecedentes mórbitos da paciente.

**Coleta e conservação das membranas amnióticas.** A placenta foi obtida de forma estéril durante o procedimento cirúrgico e acondicionada em recipiente estéril com 500 mL de solução fisiológica estéril<sup>1</sup>. Em uma capela de fluxo laminar classe II tipo B2, primeiramente a placenta foi lavada em abundância, com 1 litro solução salina estéril contendo 80 mg/L de gentamicina<sup>2</sup> para a remoção de sujidades e coágulos (Mohammadi et al. 2013). A membrana amniótica foi separada do resto da placenta por dissecação com tesoura romba e colocada em discos de papel de nitrocelulose estéril, com a face epitelial voltada para cima. A membrana amniótica foi recortada em vários fragmentos no mesmo tamanho do disco de papel de nitrocelulose. Na sequência, a membrana foi imersa em glicerina 98%<sup>3</sup>, na proporção de 1:9, e mantida por um período de 30 dias antes da sua utilização (Barbosa et al. 2013).

**Seleção dos pacientes para o procedimento e protocolo anestésico.** Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia Branco, adultos, saudáveis, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu, e mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais. O procedimento cirúrgico foi realizado em um total de 42 coelhos, que foram distribuídos em quatro grupos distintos, compostos por 10 coelhos do grupo controle (GC), 12 do grupo membrana (GM), 10 do grupo laser (GL) e 10 do grupo membrana e laser (GML).

O protocolo anestésico utilizado continha medicação pré-anestésica (MPA) composta por clorpromazina<sup>4</sup> na dose de 0,5 mg/kg e morfina<sup>5</sup> 0,5 mg/kg, ambas na mesma seringa, aplicadas por via intramuscular (IM). Após 20 minutos, foi realizada a indução na máscara com isoflurano<sup>6</sup>, seguida de manutenção anestésica inalatória com 3% de isoflurano diluído em 100% de oxigênio.

**Procedimento cirúrgico.** Os pacientes foram devidamente preparados com tricotomia da região doadora (RD), localizada na parede lateral do tórax direito, e da região receptora (RR), porção cutânea da região crâniolateral do terço médio de rádio e ulna do membro torácico direito, seguido de antisepsia prévia e cirúrgica ambas com utilização de clorexidine degermante 2% e álcool 70%.

Na RR foi realizada uma incisão quadrada de pele e subcutâneo com lâmina de bisturi número 15, utilizando como orientação um molde plástico que media 2 x 2 cm. O subcutâneo foi divulsionado de maneira romba, até que todo o fragmento fosse removido e posteriormente descartado. O mesmo procedimento foi repetido na RD, entretanto o fragmento foi utilizado como enxerto. Toda a porção subcutânea do enxerto foi removida por divulsão com tesoura, até que permanecesse somente a derme e epiderme. Em seguida, foram realizadas pequenas janelas de forma aleatória, atravessando o enxerto completamente, no sentido dorso-ventral ou crânio-caudal de acordo com o crescimento do pelo do enxerto, com auxílio de lâmina de bisturi número 11.

O enxerto foi posicionado na ferida da RR e suturado junto às bordas utilizando pontos simples separados e fio de sutura náilon 3-0. A RD foi suturada com pontos em padrão simples contínuo utilizando náilon 3-0. Uma sequência de imagens do procedimento cirúrgico pode ser observada na Figura 1.

Tanto na ferida da RR como da RD foram realizados curativos com bandagem não aderente, composto por gaze estéril umedecida com solução fisiológica e atadura de algodão, fixados com esparadrapo.

Grupo controle (GC): Os pacientes selecionados para este grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico como descrito anteriormente, com a aplicação do enxerto imediatamente após a criação da ferida sem o tecido de granulação, não sendo utilizado nenhum produto ou técnica que pudesse estimular o processo cicatricial.

Grupo membrana (GM): Após a retirada da membrana amniótica do interior do recipiente contendo glicerina 98%, a membrana amniótica foi submetida ao processo de hidratação em cuba cirúrgica contendo solução fisiológica estéril durante 30 minutos (Barbosa et al. 2013). Uma pequena amostra do meio de conservação foi enviada para cultura bacteriana e fúngica, para certificar-se de que não havia contaminação no meio de conservação. Em seguida, a membrana foi recortada do mesmo tamanho da ferida, 2,0 x 2,0 cm, e foram realizadas pequenas perfurações de forma aleatória com auxílio de uma agulha tamanho 40x16, para permitir a aderência e embebição plasmática do enxerto (Figura 2).

---

<sup>1</sup> Soro Fisiológico 0,9% Injetável 500 mL, Sanobiol®.

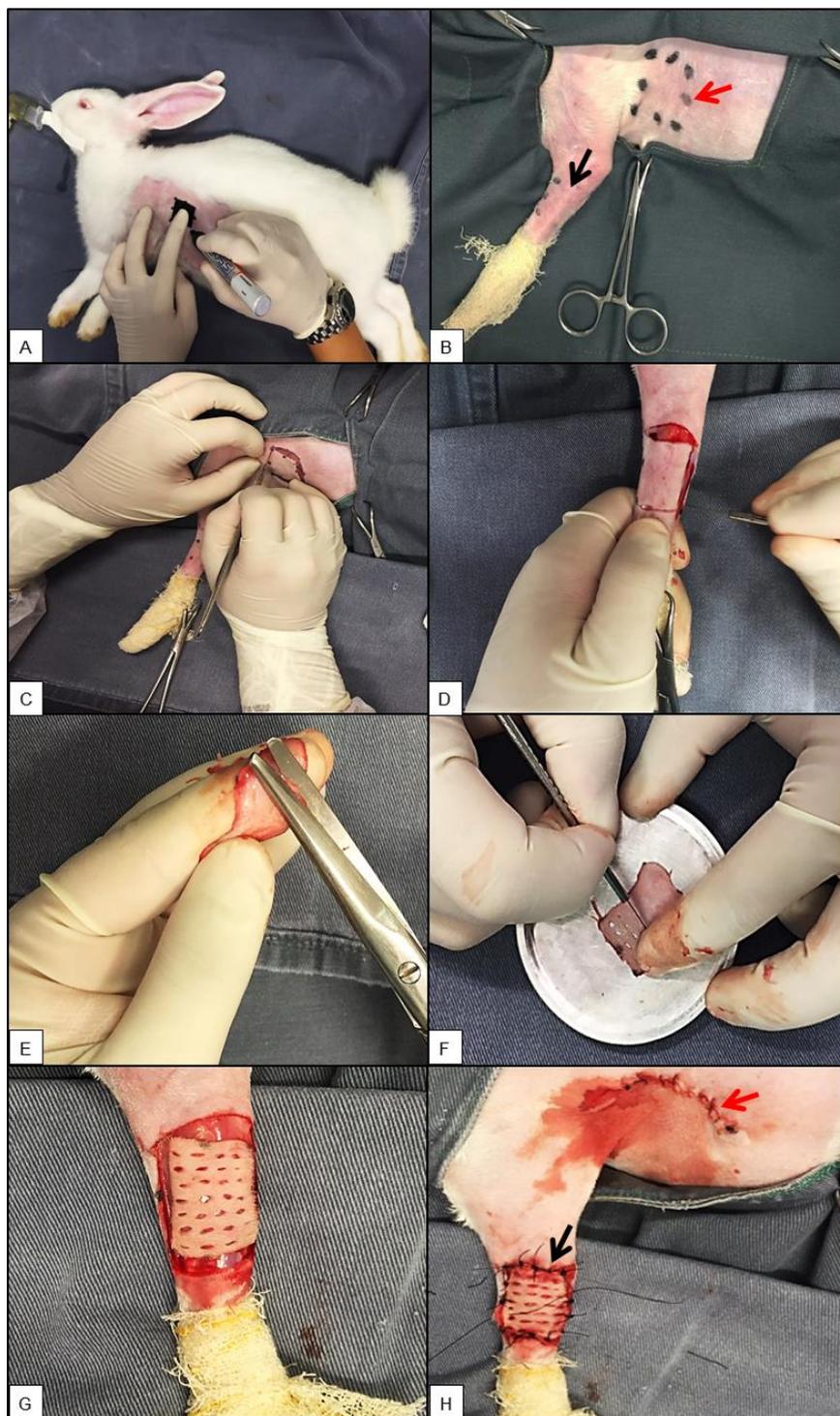
<sup>2</sup> Geramicina® 80mg/2mL, Santista.

<sup>3</sup> Glicerina bi destilada 1000 mL, MSM®.

<sup>4</sup> Amplictil® 25 mg/5mL, Hypofarma.

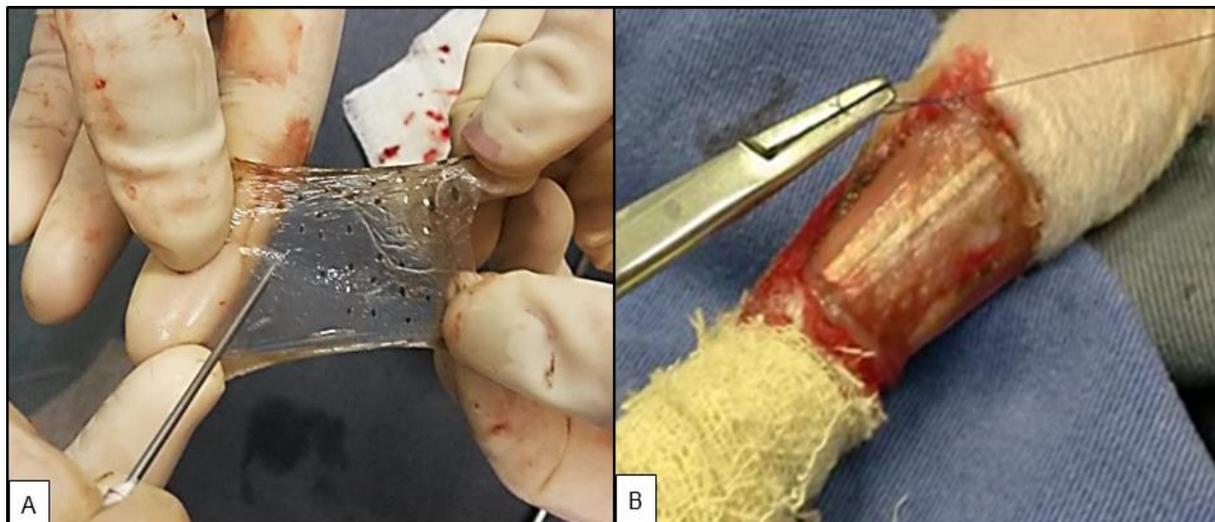
<sup>5</sup> Dimorf® 10mg, Supera Farma.

<sup>6</sup> Isoforine® 100mL, Cristália.



**Figura 1.** Fotografias do procedimento cirúrgico de enxertia cutânea em coelhos. A) Demarcação da região doadora (RD) utilizando molde plástico. B) Demarcação da RD (seta vermelha) e região receptora (RR) (seta preta). C e D) Incisão de pele para retirada dos fragmentos cutâneos. E) Dissecção do tecido subcutâneo do enxerto. F) Realização de fenestras no enxerto. G) Colocação do enxerto sobre a RR. H) Fixação do enxerto no leito receptor com pontos simples interrompidos (seta preta) e sutura da RD com pontos simples contínuos. Jaboticabal, 2015.

Após o preparo, a membrana foi então posicionada na ferida, antes da colocação do enxerto, com a face mesenquimal voltada para o leito da ferida para que ocorresse o estímulo na cicatrização. A fixação da membrana foi realizada com pontos simples separados de ancoragem nas quatro extremidades, utilizando fio poliglicaprona 25, monofilamentoso absorvível 4-0. O enxerto foi posicionado acima da membrana como descrito anteriormente no procedimento cirúrgico (Apêndice A).



**Figura 2.** Fotografia representando o preparo da membrana amniótica canina para a aplicação na região receptora dos coelhos do grupo membrana e grupo membrana e laser submetidos à enxertia cutânea. A) Notar a realização de perfurações realizadas na membrana com agulha 40x16 para permitir a aderência e embebição plasmática do enxerto. B) Colocação da membrana amniótica no leito receptor e sua fixação com pontos de ancoragem. Jaboticabal, 2015.

**Grupo laser (GL):** Os pacientes do grupo laser foram submetidos à laserterapia imediatamente após o procedimento cirúrgico. A ferida foi limpa com solução fisiológica e gaze, e em seguida, foi removido todo o excesso de umidade também com gaze. Foram escolhidos 12 pontos distintos e pré-determinados de aplicação do laser (Figura 3). Foi utilizado o aparelho de laser Laserpulse Ibramed® modelo L42, com caneta de comprimento de onda 660 nanômetros (nm) e 30 mW (*megawatt*) de potência. A dose do laser utilizada foi de 4 J/cm<sup>2</sup> em frequência contínua, durante 8 segundos em cada ponto pré-determinado.

O protocolo de laserterapia foi novamente aplicado nos pacientes no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de pós-operatório, no momento da troca do curativo, após a limpeza da ferida.

**Grupo membrana e laser (GML):** Os pacientes participantes do grupo GML foram submetidos ao procedimento cirúrgico com a mesma técnica do grupo GM, seguido da aplicação do laser assim como descrito no GL.

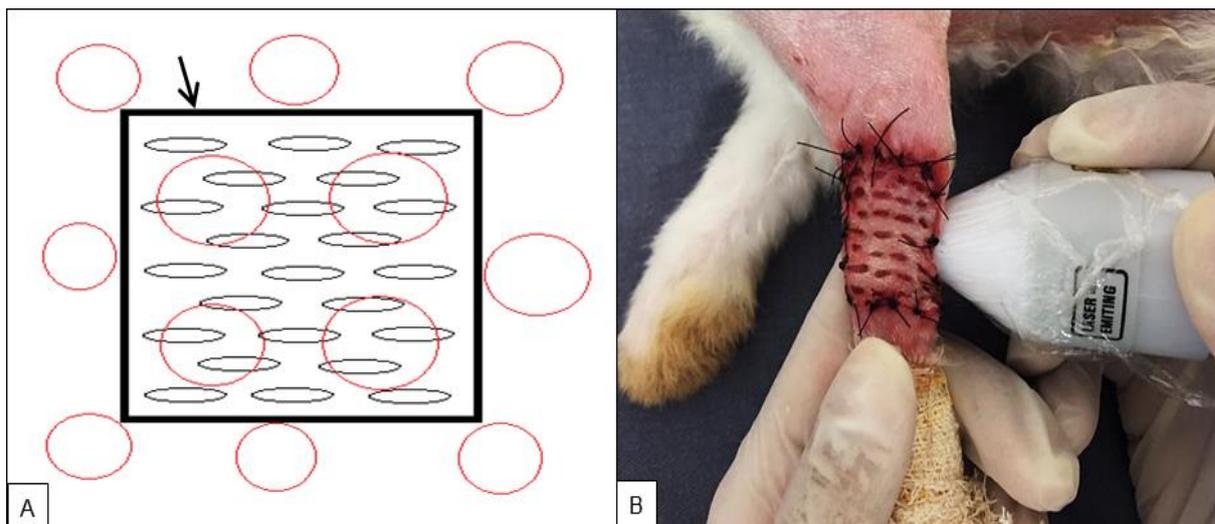
**Protocolo terapêutico pós-operatório.** Todos os pacientes receberam antibioticoperapia e analgesia no período pós-operatório, que consistiu na administração de enrofloxacina<sup>7</sup> (5 mg/kg a cada 12 horas, por via subcutânea) e cloridrato de tramadol<sup>8</sup> (3 mg/kg a cada 12 horas, por via subcutânea), ambos durante 5 dias seguidos. Também foi administrado meloxicam<sup>9</sup> 0,1 mg/kg, por via subcutânea, a cada 24 horas nos três primeiros dias do pós-operatório.

Os curativos foram trocados no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia da cirurgia em todos os grupos de tratamento, sendo nos grupos GL e GML realizados antes da sessão de laserterapia. A ferida cirúrgica foi lavada gentilmente com solução fisiológica estéril e as sujidades removidas com auxílio de gaze também estéril. O curativo foi refeito da mesma forma que no período pós-operatório imediato.

<sup>7</sup> Chemitril Injetável 2,5%®, Chemitec.

<sup>8</sup> Tramal® ampola 50 mg/mL, Searle

<sup>9</sup> Maxican® 2%, Ourofino



**Figura 3.** Figuras demonstrando a técnica de laserterapia aplicada no enxerto cutâneo dos coelhos do grupo laser (GL) e do grupo membrana e laser (GML). A) Representação esquemática das áreas pré-determinadas para a aplicação da laserterapia (círculos vermelhos) na área adjacente ao enxerto cutâneo (seta preta) dos coelhos do GL e do GML. B) Fotografia representando a aplicação da laserterapia em enxerto cutâneo no momento pós-operatório imediato em um coelho do GL. Jaboticabal, 2015.

**Avaliação física e macroscópica.** A avaliação física foi realizada por meio de análise macroscópica seguindo o preenchimento de um questionário que continha os seguintes parâmetros: presença de edema, coloração do enxerto e presença e aspecto da secreção na ferida. A avaliação foi realizada por um avaliador único, às cegas, no 3º, 7º e 15º dia do pós-operatório (Apêndice B).

O enxerto era classificado como edema ausente (EAUS) quando nenhuma tumefação do tecido adjacente a área do enxerto era notado; edema moderado (EMOD) quando havia tumefação devido ao acúmulo de líquido intersticial em alguma porção da área do enxerto; e edema intenso (EINT) quando toda a área do enxerto apresentava tumefação.

O parâmetro de coloração do enxerto foi classificado em três diferentes categorias, sendo coloração do enxerto rósea (CEROS) quando a maioria da área do enxerto apresentava coloração semelhante ao tecido normal; coloração do enxerto pálida (CEPAL) quando a maioria da área do enxerto apresentava cor esbranquiçada; e coloração do enxerto escura (CEESC) quando a maioria da área do enxerto apresentava áreas enegrecidas.

Já em relação a quantidade de secreção do enxerto, este parâmetro poderia ser ausente (QSAUS) quando nenhuma secreção era notada; moderado (QSMOD) quando em alguma porção do enxerto havia a presença de secreção; e intenso (QSINT) quando toda a área do enxerto apresentava algum tipo de secreção.

Além dos três parâmetros citados, o avaliador ainda podia fazer observações sobre presença de tecido desvitalizado, deiscência de sutura e aspecto da secreção presente, caso fosse necessário.

**Procedimento de eutanásia dos pacientes.** No 15º dia de pós-operatório os pacientes foram anestesiados com propofol (dose-resposta) e, quando se certificava da ausência de reflexos corneal e pupilar, foi realizada a aplicação de 20 mL de cloreto de potássio<sup>10</sup> por via endovenosa para a indução de assistolia.

**Processamento das amostras.** Os fragmentos de pele enxertados foram totalmente removidos por meio de incisão abrangendo uma pequena porção de pele não enxertada, seguido por dissecação (Apêndice C). As amostras foram armazenadas em formol 10% na proporção 1:9, por 48 horas e transferidas para solução de álcool 70% até o momento do processamento.

As amostras foram então incluídas em parafina e submetidas à cortes transversais de 4µ (micrometros) em micrótomo. Após o preparo das lâminas, estas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Tricômico de Masson (TM).

<sup>10</sup> Cloreto de potássio 19,1%, Euquiplax®.

**Avaliação microscópica.** As lâminas coradas com HE foram utilizadas para avaliação de parâmetros como presença de inflamação, reepitelização, integração da pele com o enxerto e presença de necrose. As avaliações foram realizadas por avaliador único, às cegas, em microscópio Nikon® E200 utilizando objetivas de 4x, 20x e 40x, sequencialmente. (Apêndice D).

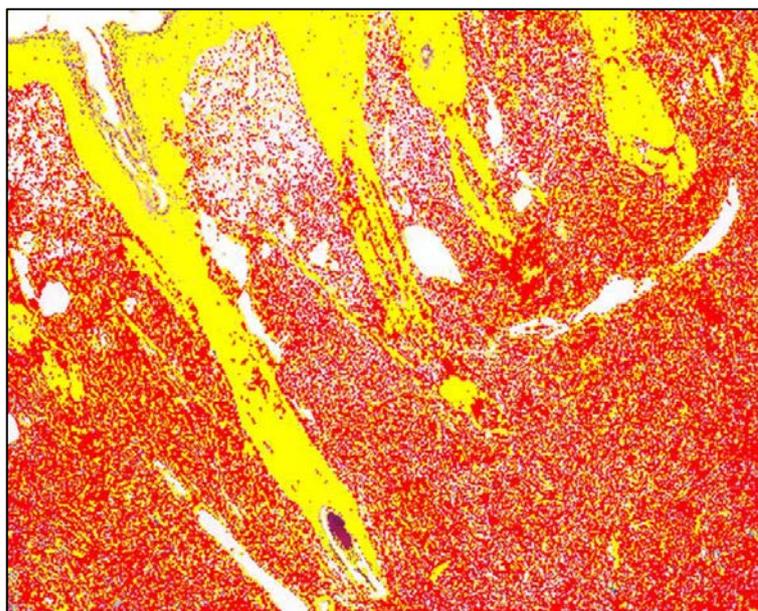
A análise consistiu no preenchimento de uma ficha contendo os parâmetros a serem avaliados. A inflamação foi classificada como ausente (IA) quando células inflamatórias, como heterófilos e linfócitos, não eram visualizadas no campo óptico; inflamação discreta (ID) quando as células inflamatórias eram evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado inflamatório; inflamação moderada (IM) quando as células inflamatórias apareciam com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado; e acentuada (IAC), quando as células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

A relação entre o enxerto e a pele foi classificada como íntegra (RELI) quando o enxerto encontrava-se totalmente integrado e conectado à ferida; e degenerado (RELD) quando a maior parte do enxerto estava desinserido de derme superficial.

A reepitelização do enxerto foi classificada como ausente (REEA), quando não havia epitélio no campo óptico; discreto (REED) quando a epitelização aparecia de forma incompleta, entretanto a área não reepitelizada era predominante; moderada (REEM) quando a epitelização aparecia de forma incompleta, entretanto a área reepitelizada era predominante; acentuada (REEAC), quando a reepitelização era visibilizada de forma completa sobre o tecido conjuntivo.

A presença de necrose no tecido enxertado foi classificada como ausente (NA) quando as células do enxerto em sua totalidade não apresentavam sinais como picnose nuclear, cariólise e eosinofilia do citoplasma; discreta (ND) quando os sinais de necrose das células do enxerto estavam presentes de forma isolada; moderada (NM) quando estes sinais ocorriam de forma multifocal; e acentuada (NAC) quando em toda a extensão do enxerto era possível visibilizar sinais de necrose celular.

Para a avaliação de formação de colágeno e tecido de granulação, as amostras foram coradas com Tricômico de Masson. Em seguida, foram realizadas fotomicrografias de toda a extensão do enxerto utilizando o *software* Motic Image-Pro Plus 2.0 ML, na objetiva de 4x. De forma aleatória, foram escolhidos três campos fotografados para a quantificação da área de formação do colágeno dentro do local do enxerto, utilizando o *software* analisador de imagens Image-Pro Plus 4.0® (Figura 4).



**Figura 4.** Imagem representativa da análise de imagem da área de formação de colágeno e tecido de granulação em enxerto cutâneo em coelhos do grupo laser. Foi utilizado o *software* Image-Pro Plus 4.0® para a análise em porcentagem de área. A porção em vermelho representa o colágeno, e a parte amarela a epiderme. Jaboticabal, 2015.

A área de formação do colágeno e do tecido de granulação era dada em porcentagem pelo *software* e então dividida em três categorias: colágeno discreto (CD) de 0 a 33%; colágeno moderado (CM) de 34 a 66%; e colágeno acentuado (CAC) de 67 a 100% de área correspondente a formação do colágeno e do tecido de granulação.

**Análise estatística.** Os resultados obtidos foram submetidos a análises de correspondências simples e múltipla. As análises foram processadas no *software* Statistica, versão 7 (StatSoft, 2004) utilizando para isso a tabela de Burt X'X onde X é a matriz original de valores ausência-presença para cada categoria. As correspondências obtidas foram às referências para avaliar os efeitos dos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

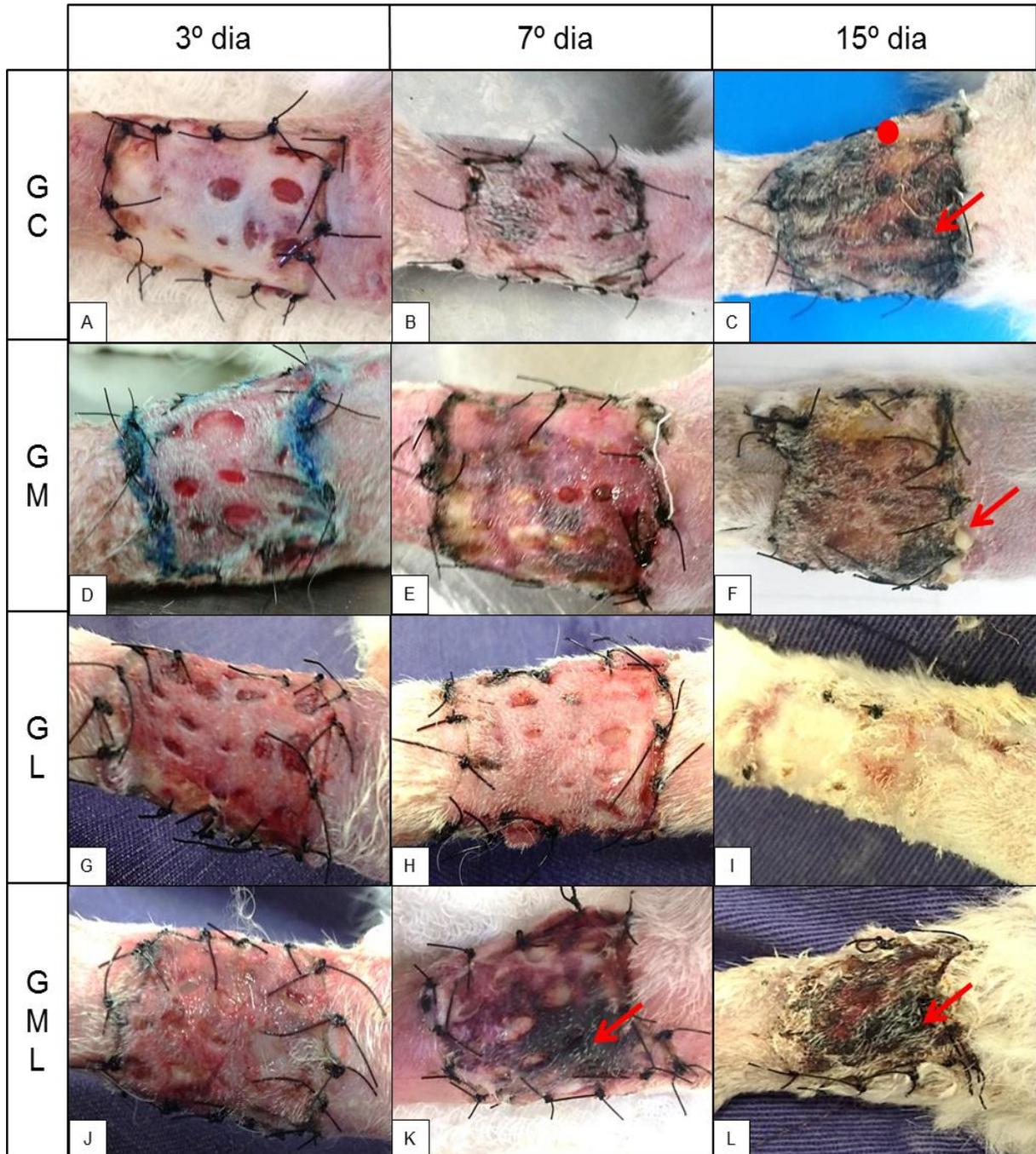
### Análise macroscópica

Após análises dos dados obtidos por meio da avaliação macroscópica dos enxertos cutâneo, foi possível observar que, de modo geral, os pacientes dos grupos onde a membrana amniótica foi utilizada com o intuito de estimular a reepitelização (GM e GML) apresentaram evidências de reação inflamatória acentuada, falha de integração do enxerto e conseqüente coloração escura do mesmo (Figura 5). Os pacientes do grupo GC não receberam nenhum adjuvante ao longo do tratamento e, como resultado final, o enxerto não integrou ao leito receptor na maioria dos casos (Figura 5). Os pacientes do grupo GL apresentaram o melhor aspecto do enxerto no último dia de avaliação, além da ausência de sinais de inflamação (Figura 5).

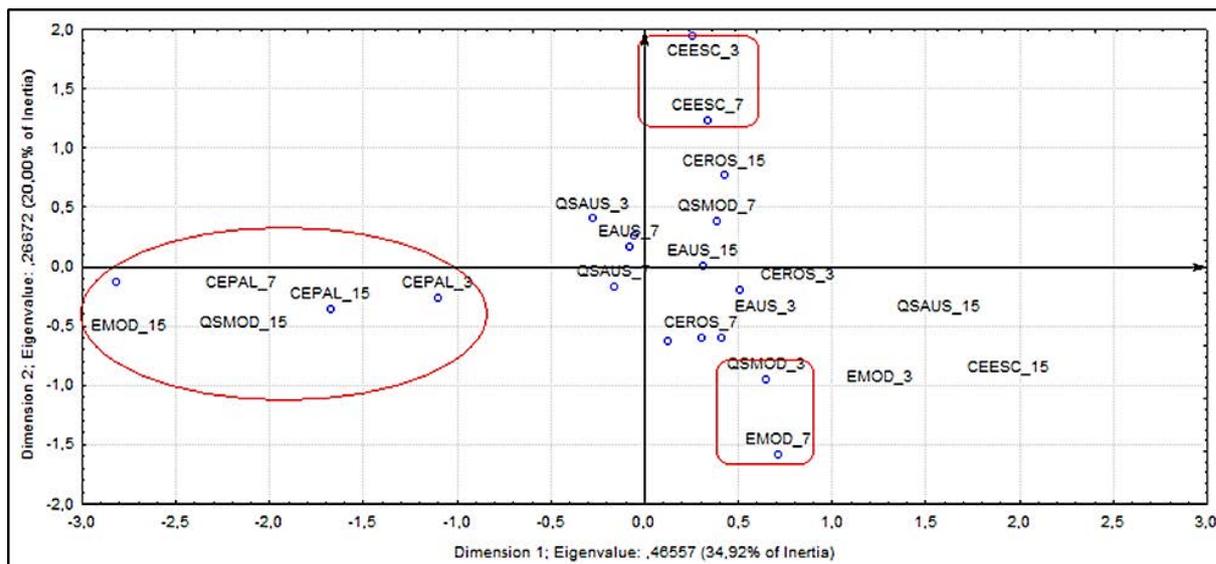
Por meio da análise de correspondência múltipla entre todos os grupos de tratamento (GC, GM, GL e GML), não foi possível identificar a existência de um processo que houvesse alguma associação entre si. Entretanto, após a aplicação da análise de correspondência simples, alguns processos foram identificados separadamente em cada grupo.

Correspondência significativa ( $p < 0,01$ ) entre CEPAL 7 e EMOD 15 e, entre CEPAL 15 e EMOD 15 foram notadas no GC. Outra correspondência significativa ( $p < 0,05$ ) entre CEPAL 7 e QSMOD 15 também foi observada (Figura 6).

Como atributo conceitual, o enxerto não possui suprimento sanguíneo autônomo, fato este que torna a sua integração na área reparada dependente de fatores que contribuam para o processo cicatricial (Andreassi et al. 2005, Miraliakbari & Mackay 2006). Nos pacientes do grupo GC, o enxerto foi aplicado na ferida imediatamente após esta ter sido criada. Portanto, infere-se que o leito receptor, constituído neste caso de tecido muscular sem granulação e de tendões, não proporcionou suprimento sanguíneo adequado pois foi observado coloração pálida do enxerto nos dias 7 e 15 do pós-operatório. O processo cicatricial do enxerto é correspondente ao que ocorre em uma ferida, desta forma, clinicamente o enxerto inicialmente possui uma coloração pálida e branca, entretanto quando ocorre completa vascularização entre o 5º e 7º dia, há uma modificação para cor rósea, o que confirma a integração do enxerto (Andreassi et al. 2005).



**Figura 5.** Fotografias ilustrativas de enxertos cutâneos em coelhos dos diferentes grupos de tratamento, durante os três momentos distintos da avaliação macroscópica. A) Aparência macroscópica do enxerto no 3º dia de pós-operatório (PO) de coelho do grupo controle (GC). B) 7º dia de PO do grupo GC. C) 15º dia de PO do grupo GC, observa-se área de necrose (seta) e integração parcial do enxerto (círculo). D) 3º dia de PO do grupo membrana (GM). E) 7º dia de PO do grupo GM. F) 15º dia de PO do grupo GM, observar secreção purulenta (seta). G) 3º dia de PO do grupo laser (GL). H) 7º dia de PO grupo GL. I) 15º dia de PO do grupo GL, notar integração total do enxerto. J) 3º dia de PO do grupo membrana e laser (GML). K) 7º dia de PO de coelho do grupo GML, observar área de necrose (seta). L) 15º dia de PO grupo GML, área de necrose (seta). Jaboticabal, 2015.



**Figura 6.** Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples da avaliação macroscópica da enxertia cutânea dos pacientes do grupo controle (GC). Os parâmetros presentes dentro do círculo apresentaram associação estatisticamente significativa, e os dentro dos retângulos embora houvesse associação, não foram significativas. Legenda: edema ausente (EAUS); edema moderado (EMOD); edema intenso (EINT); coloração do enxerto pálida (CEPAL); coloração do enxerto rósea (CEROS); coloração do enxerto escuro (CEESC); quantidade de secreção ausente (QSAUS); quantidade de secreção moderada (QSMOD); quantidade de secreção intensa (QSINT). Os números 3, 7 e 15 correspondem aos dias das análises macroscópica. Jaboticabal, 2015.

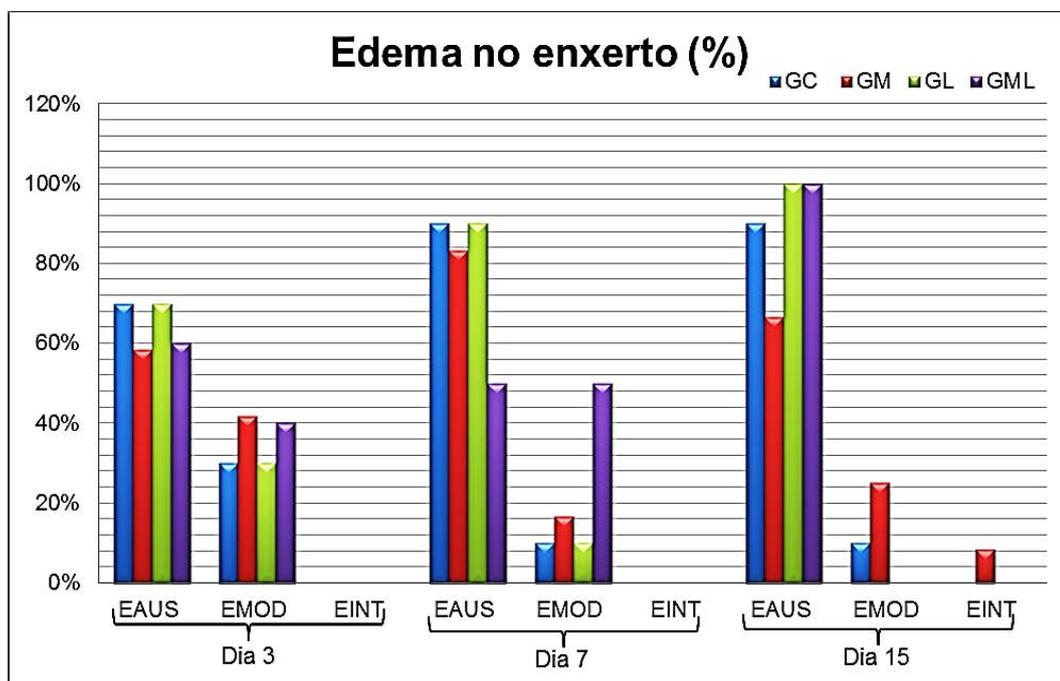
Tong e Simpson (2012) relatam boa resposta clínica em enxertos aplicados em feridas criadas imediatamente após a sua criação em porção distal de membro de cães submetido à excisão tumoral. Entretanto, trata-se de um estudo retrospectivo de apenas 7 casos clínicos, onde diversos fatores podem ter interferido como *status* clínico dos pacientes, tipo da neoplasia e localização da lesão. Além disso, o fato de tratar-se de um estudo retrospectivo acaba interferindo na padronização da técnica aplicada, assim como a avaliação criteriosa da evolução da ferida.

Os eventos CEPAL 7, QSMOD 15 e EMOD 15 estão associados, ou seja, a ocorrência de um fator é dependem de outro correspondente. Tal fato indica a presença de reação inflamatória no 15º dia do processo de cicatrização, associado ao fato de que também não houve adequada nutrição do enxerto no grupo GC, a reação inflamatória neste caso pode ser relacionada a tentativa de degradação do enxerto desvitalizado. Miraliakbari e Mackay (2006) apontam dentre as principais falhas na integração do enxerto a baixa capacidade do leito receptor em nutrir o enxerto, como observado no grupo GC. Além disso, é possível inferir que neste caso houve também um atraso na cronologia dos eventos da cicatrização, pois elementos como secreção e edema não deveriam estar presentes no 15º de um processo normal de cicatrização.

As outras correspondências encontradas dentro dos grupos GM, GL e GML são fracas e sem significância. Entretanto, uma observação frequente foi a presença de grande quantidade de secreção purulenta associada à presença de tecido desvitalizado no 15º do pós-operatório nos grupos GM e GML. Miraliakbari e Mackay (2006) relatam que qualquer obstáculo entre o enxerto e o leito receptor pode resultar em falha na sua integração, o que pode ter ocorrido no caso dos grupos GM e GML devido a presença da membrana amniótica. Além disso, a presença de secreção purulenta pode indicar infecção da ferida provavelmente devido a intensa reação inflamatória que propiciou a contaminação, já que a cultura bacteriológica do meio de conservação da membrana foi negativa.

Em relação à presença de edema no enxerto, a sua quantidade foi menor quando comparou-se a primeira avaliação (dia 3) e a última (dia 15), em todos os grupos (Figura 7). Tal achado é bastante consistente com a fisiologia da cicatrização do enxerto, onde inicialmente na fase de embebição plasmática há um acúmulo de líquido intersticial que irá nutrir o enxerto e provocar uma reação edematosa que

atingirá seu pico em 48 a 72 horas, com diminuição a partir do momento que a nutrição passa ser suprida pelos neovasos (Chick 1988, Andreassi et al. 2005, Hierner et al. 2005, Pavletic 2007).



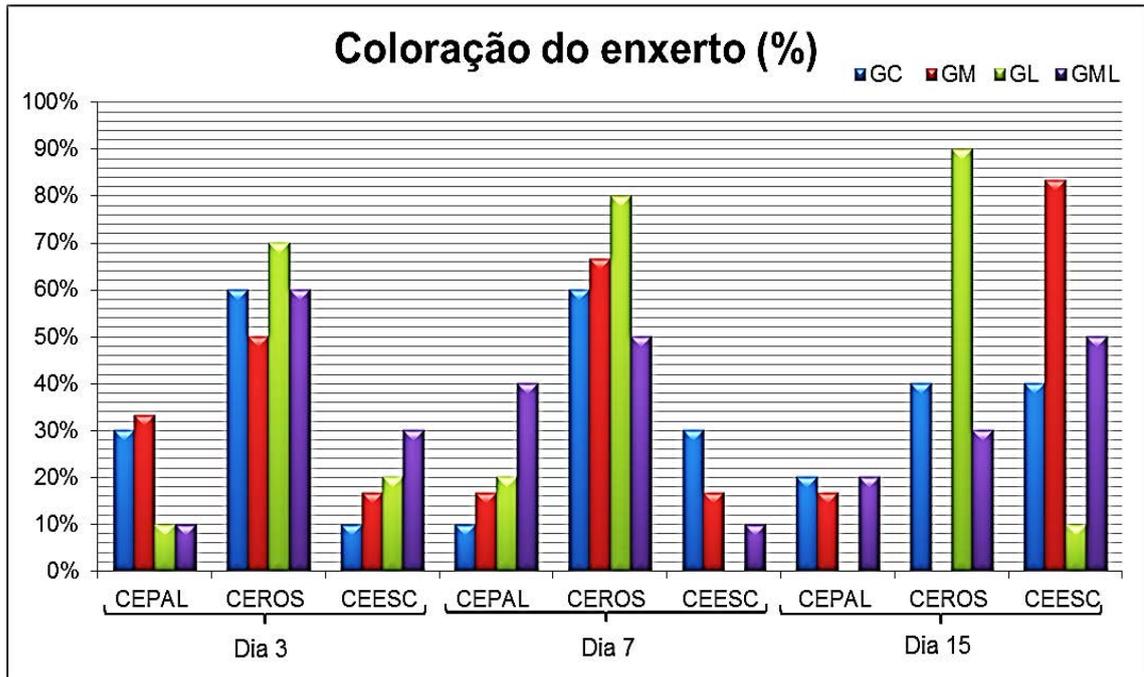
**Figura 7.** Média percentual da quantidade de edema no enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: edema ausente (EAUS); edema moderado (EMOD) e edema intenso (EINT); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

Já em relação a coloração do enxerto, o que chamou atenção foi a grande predominância de enxertos róseos do grupo GL no 15º dia pós-operatório, e da coloração escura para os grupos GM e GML também no mesmo período (Figura 8). Entretanto, observou-se também que a maioria dos enxertos no grupo GL permaneceu com a coloração rósea desde a primeira avaliação, ou seja, a partir do 3º dia do pós-operatório. Este achado pode sugerir que a laserterapia acelerou o processo de vascularização do enxerto por meio da modulação celular causada pelos seus efeitos, o que corrobora com diversos estudos, pois nesta fase ainda esperava-se que enxerto estivesse pálido (Andreassi et al. 2005, Posten et al. 2005, Corazza et al. 2007).

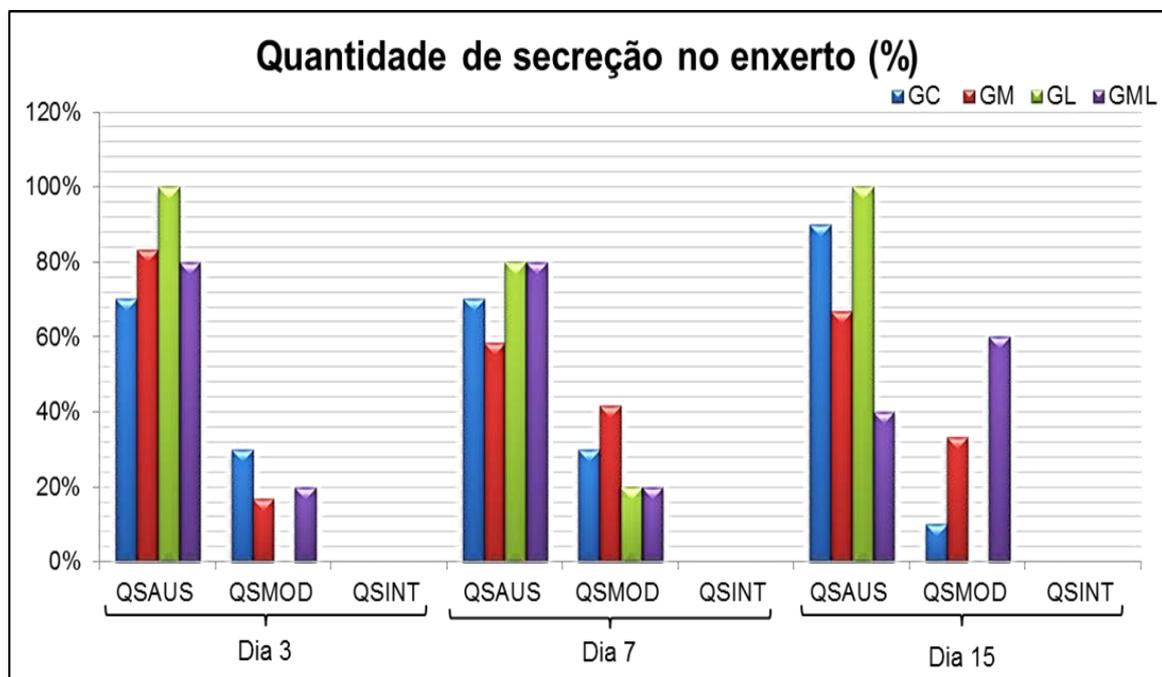
A quantidade de secreção aumentou levemente entre os períodos de avaliação, ficando um pouco mais evidente este aumento para os grupos GM e GML, provavelmente devido a maiores reação inflamatória, como já discutido acima (Figura 9).

### Análise microscópica

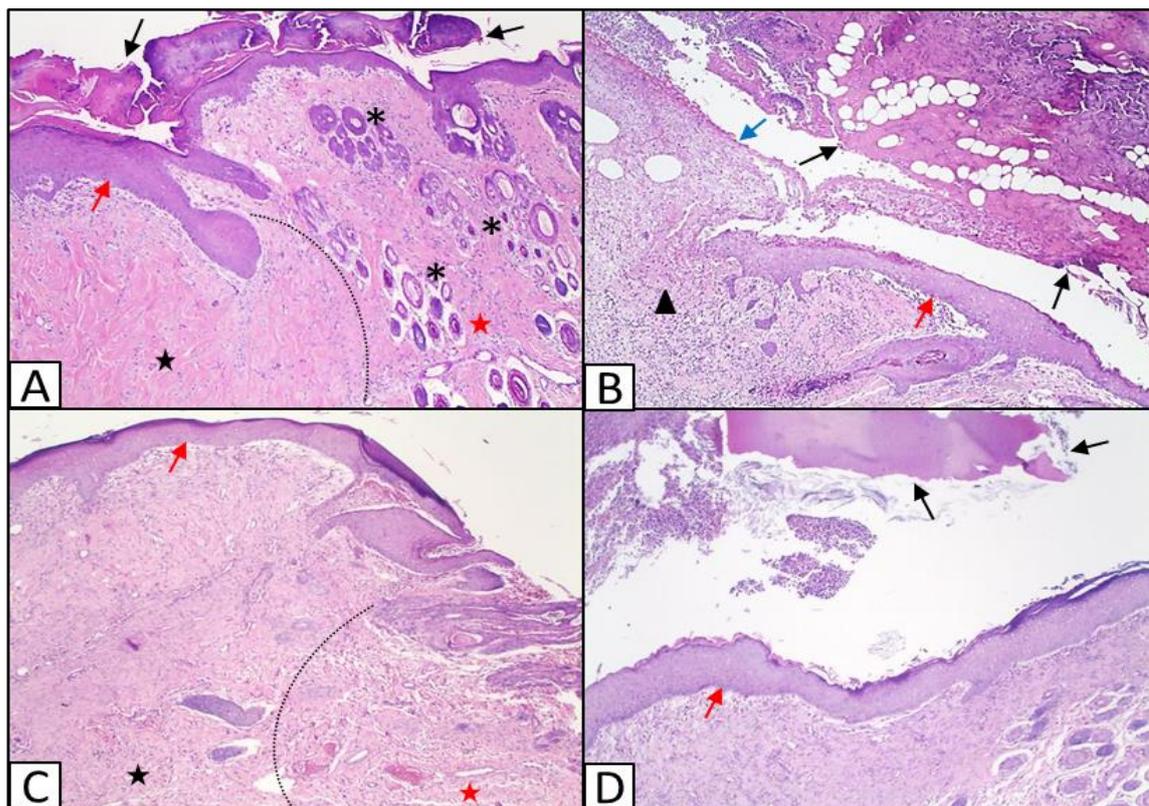
Por meio da análise microscópica das amostras foi possível observar um processo cicatricial mais eficiente nos pacientes do grupo GL quando comparado aos outros grupos de tratamento, onde na maioria das amostras, observou-se intensa integração do enxerto à derme, reepitelização acentuada e escassas células inflamatórias no local do enxerto (Figura 10).



**Figura 8.** Média percentual da coloração do enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: coloração pálida (CEPAL); coloração rósea (CEROS); coloração escura (CEESC); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.



**Figura 9.** Média percentual da quantidade de secreção no enxerto cutâneo em coelhos, na avaliação macroscópica nos dias de avaliação 3, 7 e 15, dos quatro grupos de tratamento. Legenda: quantidade de secreção ausente (QSAUS); quantidade de secreção moderada (QSMOD); quantidade de secreção intensa (QSINT); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

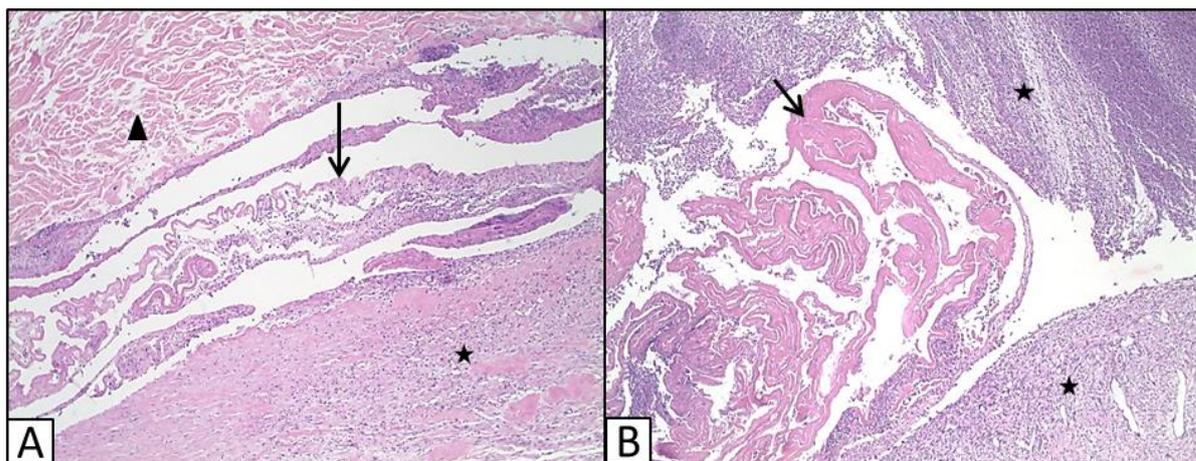


**Figura 10.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de transição (pontilhado) entre a epiderme original (estrela vermelha), com os anexos cutâneos (\*) e o segmento reepitelização (seta vermelha) associada à proliferação de colágeno (estrela preta). Na superfície epidermal verifica-se o enxerto desvitalizado e não integrado à região receptora (setas pretas / grupo controle). B) Derme superficial com acentuado infiltrado inflamatório (cabeça de seta), foco de reepitelização parcial (seta vermelha) e presença de enxerto degenerado (setas pretas) e não integrado à derme (seta azul / grupo membrana). C) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e área de reepitelização (seta vermelha), com integração completa do enxerto cutâneo (estrela preta / grupo laser). D) reepitelização completa da pele (seta vermelha), sem integração do enxerto que encontra-se degenerado (setas pretas / grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.

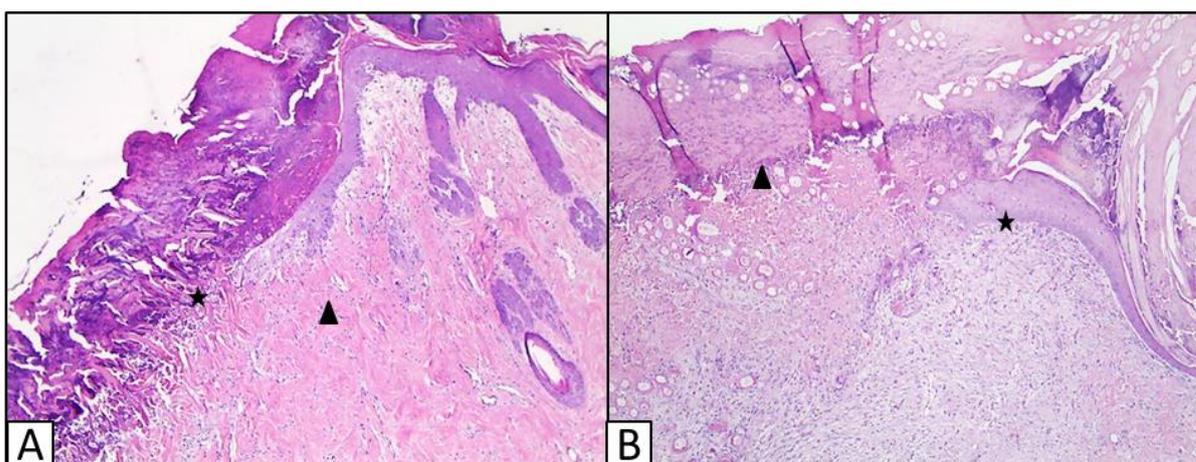
O contrário foi observado nos pacientes dos grupos GM e GML, onde aparentemente a presença da membrana amniótica parece ter induzido resposta inflamatória bastante consistente na região adjacente à membrana e ao enxerto (Figura 11). Já os enxertos do grupo GC, embora não tenham apresentado uma interação inflamatória tão evidente, não tiveram boa integração do enxerto à derme superficial, assim como as áreas presentes de reepitelização eram apenas parciais (Figura 12).

Após a aplicação da análise de correspondência múltipla com os resultados de todos os tratamentos, foi possível a identificação de três grupos de categorias contendo correspondências específicas em cada grupo. O primeiro grupo diz respeito à presença de IAC, NAC, REED, REEA e RELD. Esta correspondência esteve presente no grupo GM e no GML e ausente no GL (Figura 13), sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

O fato de estas correspondências estarem presentes nos grupos GM e GML demonstram de forma clara que a presença da membrana amniótica impediu a integração do enxerto ao leito receptor. Dentre as principais propriedades da membrana amniótica estão a sua baixa imunogenicidade, ações antiinflamatória e antibacteriana, além de promover estímulo à epitelização (Toda et al. 2007, Niknejad et al. 2013), entretanto estes fatores não foram observados em nosso estudo, sendo possível afirmar que houve rejeição acentuada desta membrana biológica.



**Figura 11.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Notar a presença da membrana amniótica (seta) entre o enxerto (cabeça de seta) e a região receptora (estrela / grupo membrana). Objetiva 4x. B) Presença da membrana amniótica (seta) induzindo intensa resposta inflamatória (estrelas / grupo membrana). Objetiva de 20x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.

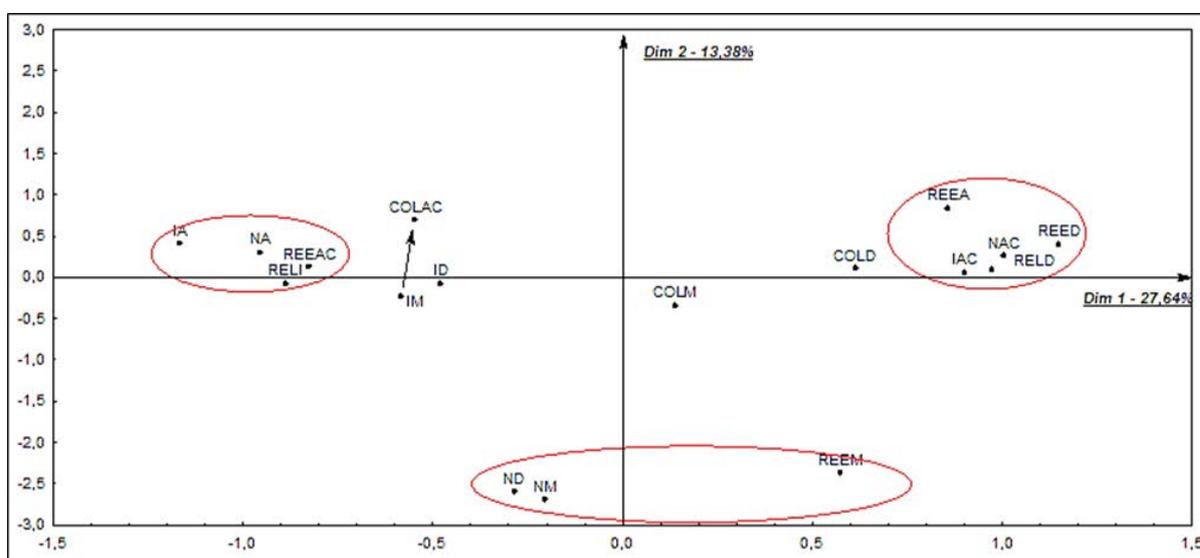


**Figura 12.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de transição onde o enxerto ainda está integrado à pele, embora necrótico (estrela). Há área de tecido de granulação e área com reepitelização parcial (cabeça de seta). B) Presença de inflamação moderada, junto a área em que houve reepitelização parcial (estrela). Observar que a área onde o enxerto está integrado não há reepitelização (cabeça de seta / grupo controle). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.

A característica da baixa imunogenicidade da membrana amniótica foi fator crucial para a escolha do modelo xenógeno neste estudo. Diversos estudos demonstram sucesso na utilização do âmnion em modelo xenógeno, como o uso de membrana amniótica humana em ratos e coelhos, utilização da membrana amniótica equina em cães, entre outras combinações (Robson & Krizek 1972, Barros et al. 1998, Koizumi et al. 2000, Kubo et al. 2001, Nakamura et al. 2003). A indicação do uso xenógeno da membrana amniótica é comum, e correlacionada às características próprias do seu papel de impedir com que o feto seja rejeitado durante seu desenvolvimento (Kubo et al. 2001). Contudo, o modelo da aplicação da membrana amniótica canina em coelhos não tinha sido realizado anteriormente, criando desta forma a necessidade de investigações para elucidar se existe algum tipo de rejeição imunológica entre as espécies, fato que talvez justificasse os resultados encontrados neste trabalho.

Subrahmanyam (1995) utilizou a membrana amniótica colocada acima de microenxertos cutâneos para o tratamento de feridas abertas em humanos, e observou epitelização cutânea precoce e menor tempo de cicatrização. Em nosso estudo, a membrana foi colocada entre o enxerto e a derme, com a face epitelial voltada para o enxerto e a face mesenquimal voltada para a ferida, com o intuito de estimular a epitelização. Entretanto, sabe-se que alguns efeitos da membrana amniótica são dependentes de qual face esta é aplicada, sendo assim, o enxerto pode ter necrosado, pois a face epitelial a qual o mesmo se encontrava em contato, possui potencial antiangiogênico, ao contrário da face mesenquimal que possui efeitos de neoangiogênese (Niknejad et al. 2013).

O segundo grupo de categorias identificou uma correspondência específica ao grupo GL, onde houve correspondência entre IA, NA, REEAC e RELI (Figura 13). Esta segunda associação é o oposto da observada na primeira descrita e foi estatisticamente significativa entre IA e NA para  $p < 0,10$ , e para as demais associações foi  $p < 0,05$  (Tabela 1). O terceiro grupo de categorias envolveu a correspondência entre a ND, NM e REEM (Figura 13), entretanto esta relação ocorre independente das duas primeiras e é estatisticamente significativa para  $p < 0,10$  (Tabela 1).



**Figura 13.** Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla dos achados microscópicos entre todos os grupos de tratamento do enxerto cutâneo em coelhos. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegro (RELI); relação enxerto x pele degenerado (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderado (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC). Jaboticabal, 2015.

Os processos envolvidos na estimulação da irradiação luminosa ainda não são estabelecidos por completo. Entretanto, sabe-se que os resultados da interação do laser com a matéria podem ser elucidados pela observação de efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (Rocha 2004). No passado, era possível afirmar que estes efeitos estimulatórios eram justificados por meio de reações de fotobioativação e bioestimulação. Entretanto após a observação também de efeitos inibitórios, o termo biomodulação passou traduzir de forma mais verídica os mecanismos até então conhecidos no uso da LBI (Schindl et al. 2000, Lucas et al. 2002).

Os efeitos clínicos da aplicação da LBI na modulação de processos cicatriciais são motivo de numerosas discussões. Lucas et al. (2002) realizaram uma revisão sistemática de 36 estudos com resultados positivos e negativos do uso da LBI tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro*. Como conclusão, os autores não indicam o uso deste tipo de fototerapia como tratamento adjuvante no manejo de feridas, pois não há evidências suficientes para fundamentar a sua aplicação. Whinfield e

Aitkenhead (2009) em estudo similar ressaltam a escassez de conhecimento dos mecanismos de ação e falta de padronização para o uso terapêutico da técnica, o que resultou também na não indicação do uso da LBI pelos autores. Contudo, nossos achados contrariam estes autores e mostram uma melhora evidente da cicatrização do enxerto quando a LBI foi utilizada de forma isolada (grupo GL) e corrobora com estudos que demonstraram a capacidade do laser na bioestimulação de feridas causadas experimentalmente em coelhos e ratos (Peplow et al. 2010).

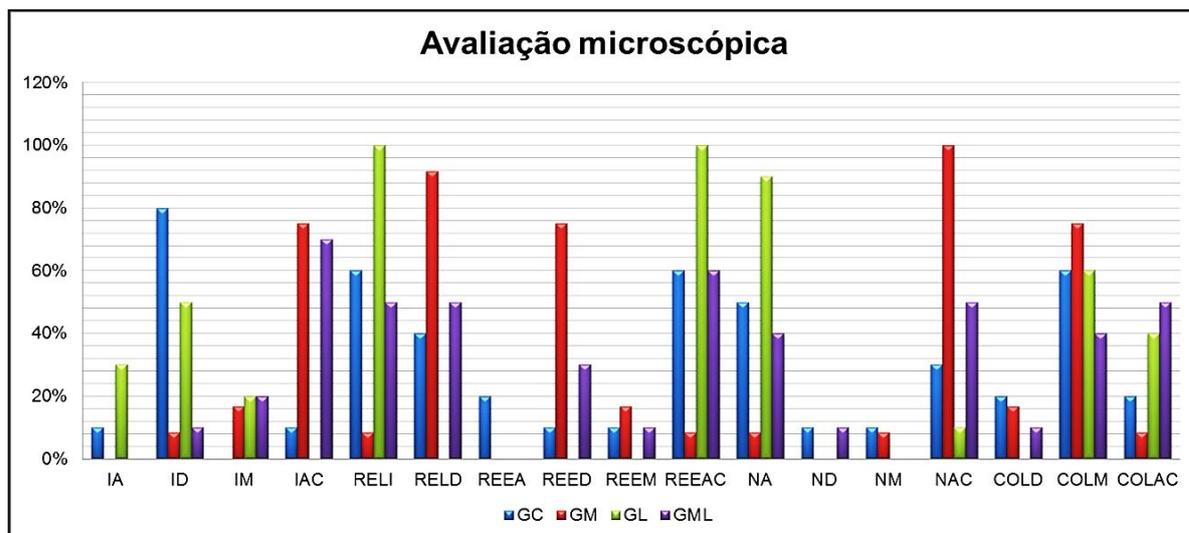
**Tabela 1.** Matriz de correspondências entre as categorias analisadas dos achados microscópicos entre todos os grupos de tratamento do enxerto cutâneo em coelhos. Os valores em vermelho representam significância de  $p < 0,05$ , e em azul para  $p < 0,10$ . Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegro (RELI); relação enxerto x pele degenerado (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderado (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC). Jaboticabal, 2015.

	IA	ID	IM	IAC	RELI	RELD	REEA	REED	REEM	REEAC	NA	ND	NM	NAC	COLD	COLM
IA																
ID	-1,19523															
IM	-0,75593	-1,46385														
IAC	-1,27242	-2,46403	-1,55839													
RELI	1,3159	1,12122	0,48349	-1,97875												
RELD	-1,38013	-1,17595	-0,50709	2,07533	-3,23669											
REEA	-0,43644	0,33806	-0,53452	0,2117	-1,02353	1,07349										
REED	-1,1127	-1,22654	-0,62897	2,06553	-2,60951	2,73687	-0,7868									
REEM	-0,61721	-0,35857	0,56695	0,29939	-0,75664	0,79358	-0,43644	-1,1127								
REEAC	1,22263	0,97197	0,39406	-1,74017	2,57922	-2,70511	-1,04654	-2,66815	-1,48003							
NA	1,62838	0,85003	0,7804	-2,05197	2,55096	-2,67547	-0,95119	-2,42507	-1,34519	2,66466						
ND	-0,43644	0,33806	-0,53452	0,2117	0,93048	-0,9759	-0,30861	-0,7868	1,85485	-0,091	-0,95119					
NM	-0,43644	0,33806	1,33631	-0,89974	-0,04652	0,0488	-0,30861	-0,7868	1,85485	-0,091	-0,95119	-0,308607				
NAC	-1,34519	-1,0694	-1,04053	2,2752	-2,83776	2,97626	1,15144	2,93561	0,1416	-2,60561	-2,93176	-0,95119	-0,95119			
COLD	-0,69007	0,16036	-0,84515	0,6862	-1,00043	1,04926	-0,48795	0,36364	0,75907	-0,44605	-0,17414	-0,48795	-0,48795	0,49077		
COLM	0,40119	-0,31076	-0,83152	0,5913	-0,02632	0,0276	-0,17457	0,45364	0,40119	-0,45688	-0,68675	0,741941	0,741941	0,20532	-1,72516	
COLAC	-0,13363	0,34503	1,74574	-1,29641	0,68376	-0,71714	0,56695	-0,8895	-1,06904	0,94737	1,10365	-0,755929	-0,755929	-0,61314	-1,19523	-2,67261

Por meio da análise de fatores e aplicação do teste de Fisher foi possível observar que a presença de necrose, relação pele e enxerto, e inflamação ocorrem inversamente à reepitelização. Nos grupos GM e GL estes padrões foram opostos, sendo no GL a média geral maior e positiva, e nos grupos GC e GML estes fenômenos não estavam presentes. Como  $p < 0,05$  rejeita-se  $H_0$  e admite-se então que os tratamentos GM e GL diferem entre si (Tabelas 2). Logo, é possível afirmar que em nosso estudo, quanto maior a quantidade de necrose, mais degenerado o enxerto estará, e também será maior a quantidade de inflamação presente (Figura 14). Este fato ocorreu no grupo GM, onde a maior parte da inflamação era constituída de heterófilos, na maioria das vezes próximo ao enxerto, e de linfócitos, localizados principalmente ao redor da membrana amniótica.

**Tabela 2.** Teste de comparações múltiplas de médias (LSD - Fisher) entre todos os tratamentos da enxertia cutânea em coelhos. Legenda: grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

Tratamento	Média	
GM	-0,949181	B
GML	-0,067847	A
GC	0,215790	A
GL	0,991074	C



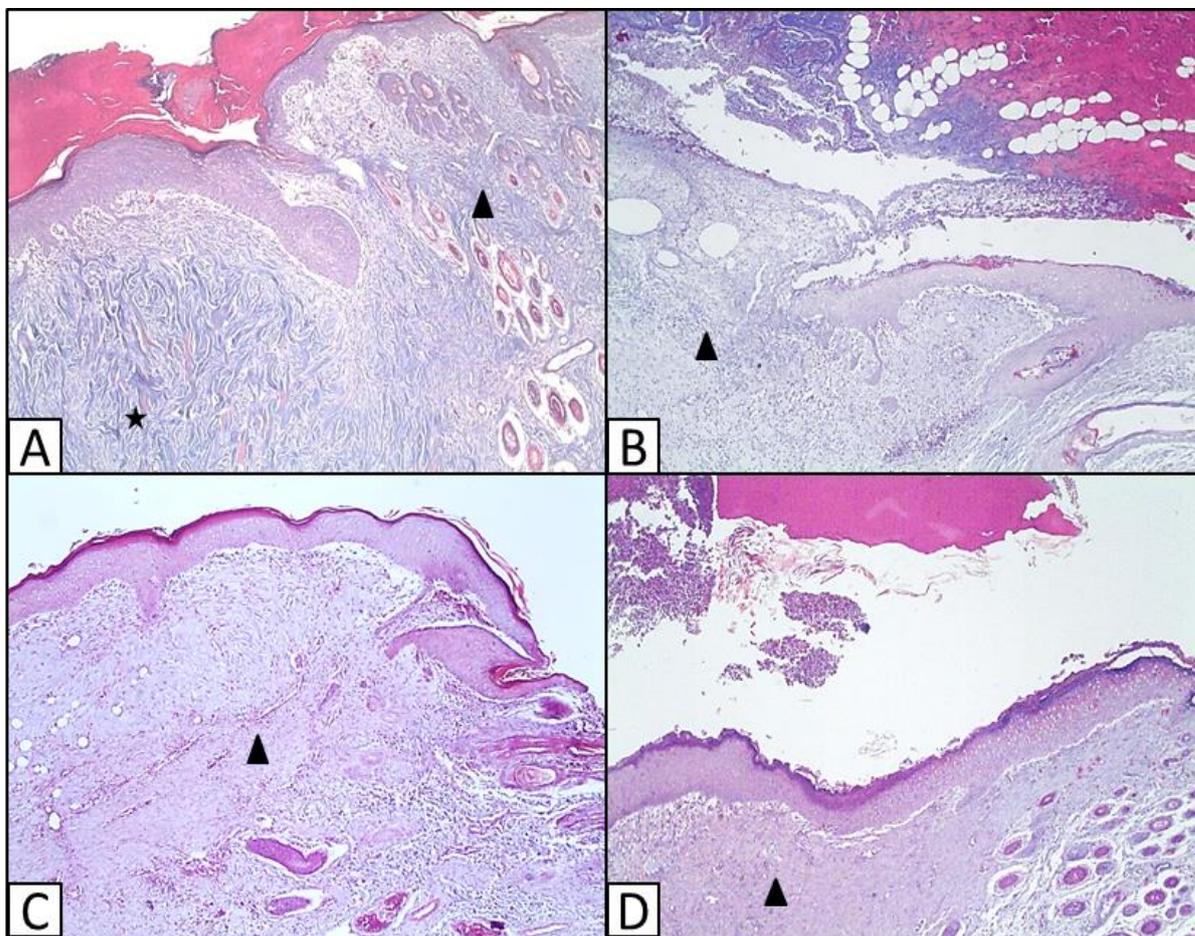
**Figura 14.** Média percentual dos parâmetros da avaliação microscópica em cada grupo de tratamento dos coelhos submetidos à enxertia cutânea. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegro (RELI); relação enxerto x pele degenerado (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderado (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

Um fator que pode ser ligado ao insucesso no tratamento do grupo GM, se dá pela barreira física criada pela membrana amniótica que pode ter impedido a nutrição do enxerto que encontrava-se acima desta. Entretanto, esta barreira deveria somente provocar a necrose do enxerto e sua falha na integração, mas não se esperava que houvesse também a falha da reepitelização da ferida. Segundo estudos, em casos onde a membrana amniótica é utilizada para cobrir determinada área e posteriormente ser removida ou desprender por si mesma da ferida, esta irá exercer a função de bandagem, permitindo que a reepitelização ocorra abaixo dela (Dua et al. 2004). Ademais, a membrana também pode ser utilizada como enxerto, neste caso existe uma incorporação ao tecido hospedeiro e a membrana passa a servir como uma estrutura para o transplante celular e consequente epitelização (Nakamura et al. 2003, Dua et al. 2004). Com isso, é possível deduzir que a falha da reepitelização tenha ocorrido devido à presença do processo inflamatório intenso no grupo GM.

Os efeitos de estimulação cicatricial causados pela LBI ao notar ausência de necrose, escassez de inflamação e presença de integração do enxerto à derme foram correlacionados a acentuada reepitelização nos pacientes do grupo GL, corroboram com estudos que também demonstraram incremento no processo cicatricial quando a LBI foi utilizada (Araujo et al. 2007, Gonçalves et al. 2007, Peplow et al. 2010). Entretanto, nos pacientes do grupo GML, a laserterapia não foi eficaz para promover resultados semelhantes como os encontrados no grupo GL, embora estes achados também não tenham sido extremos como no caso do grupo GM. Desta forma, podemos inferir que o LBI proporcionou biomodulação celular no leito da ferida, mas não o suficiente para promover a integração do enxerto no grupo GML, provavelmente pela presença da membrana amniótica.

Em nosso estudo, a formação de colágeno e de tecido de granulação não dependeu dos outros fatores analisados como inflamação, necrose, integridade do enxerto e reepitelização e também não foi diferente em termos de quantidade entre os grupos de tratamento (Figura 14). Entretanto, foi observado que no grupo GL, o colágeno formado era predominantemente maduro e estruturado enquanto este era mais jovem e desorganizado no grupo GC (Figura 15). Esta observação demonstra uma diferença de fases no processo de cicatrização entre os grupos, uma vez que a análise do colágeno e do tecido de granulação foi realizada no mesmo momento em todos os tratamentos. O colágeno tem papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações celulares (Rocha

2004). Este achado reforça a hipótese de que a LBI de certa forma acelerou o processo de cicatrização nos pacientes do grupo GL, corroborando com outros estudos (Araujo et al. 2007, Gonçalves et al. 2007, Peplow et al. 2010).



**Figura 15.** Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. A) Área de intensa formação de colágeno jovem abaixo da área de reepitelização (estrela) em contraste com área do epitélio original, apresentando colágeno maduro (cabeça de seta / grupo controle). B) Área onde a formação de colágeno ocorreu pobremente devido a intensa inflamação local (cabeça de seta / grupo membrana). C) Presença de formação de colágeno maduro e estruturado com áreas de inflamação discreta (cabeça de seta / grupo laser). D) Área abaixo do epitélio reepitelizado, onde a formação de colágeno foi discreta (triângulo / grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração Tricômico de Masson. Jaboticabal, 2015.

A associação dos dados das análises macro e microscópicas permitiu a comparação entre as técnicas adjuvantes testadas na epitelização de enxertos cutâneos em coelhos, onde a laserterapia promoveu excelente integração do enxerto e acelerou as fases do processo cicatricial. Já em relação a membrana amniótica, mais estudos devem ser feitos no intuito de investigar uma potencial rejeição imunológica entre as espécies estudadas, pois esta terapia adjuvante não foi eficaz.

### CONCLUSÃO

A utilização do enxerto cutâneo em coelhos imediatamente após a criação da ferida a ser reparada necessita de técnica adjuvante para estimular a sua integração, pois o leito sem tecido de granulação não proporcionou adequada vascularização ao enxerto. Dentre as técnicas testadas, a laserterapia foi a única

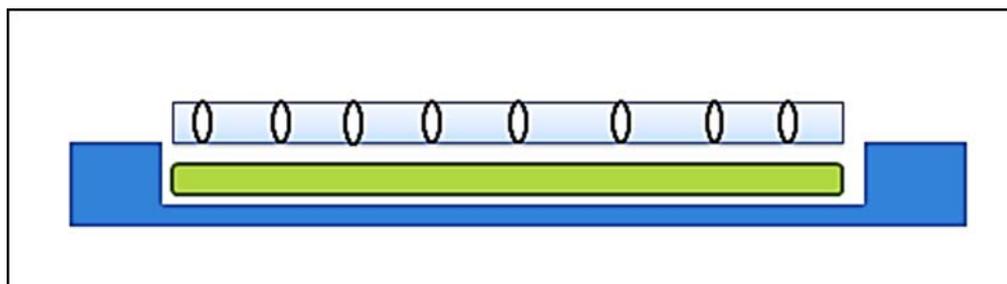
efetiva, contribuindo para o processo cicatricial e integração do enxerto. Já a membrana amniótica canina não deve ser utilizada para este fim, pois provoca intensa reação inflamatória além de impedir a nutrição do enxerto.

#### REFERÊNCIAS

- Andreassi A., Bilenchi R., Biagioli M. & D'aniello C. 2005. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin. Dermatol.* 23 (4):332-337.
- Araujo C.E., Ribeiro M.S., Favaro R., Zezell D.M. & Zorn T.M. 2007. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J. Photochem. Photobiol. B.* 86 (2):87-96.
- Barbosa A., Moraes Barros P.S.D., Guerra J.L. & Otsuki D.A. 2013. Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica equina: Estudo clínico e morfológico. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 50 (3):211-219.
- Barros P.S., Garcia J.A., Laus J.L., Ferreira A.L., & Salles Gomes T.L. 1998. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet. Ophthalmol.* 1(2-3):119-123.
- Chick L.R.B. 1988. History and biology of skin grafting. 1988. *Ann. Plast. Surg.* 21(4):358-365.
- Corazza A.V., Jorge J., Kurachi C. & Bagnato V.S. 2007. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed. Laser Surg.* 25 (2):102-106.
- Dua H.S., Gomes J.A., King A.J. & Maharajan V.S. 2004. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* 49 (1):51-77.
- Ferraudo A.S. 2014. Técnicas de análise multivariada- uma introdução. Jaboticabal/Unesp: 76p.
- Fowler D. 2006. Distal Limb and Paw Injuries. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 36 (1):819-845.
- Gonçalves W.L.S., Souza F.M., Conti C.L., Cirqueira J.P., Rocha W.A., Pires J.G.P. & Moyses M.R. 2007. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40 (6):877-884.
- Hierner R., Degreef H., Vranckx J.J., Garmyn M., Massagé P. & Van Brussel M. 2005. Skin grafting and wound healing the "dermato-plastic team approach". *Clin Dermatol.* 23(4):343-352.
- Koizumi N., Inatomi T., Quantock A.J., Fullwood N.J., Dota A. & Kinoshita S. 2000. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea.* 19 (1):65-71.
- Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R. & Usui M. 2001. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (7):1539-1546.
- Lofêgo Filho J.A., Dadalti P., Souza D.C.D., Souza P.R.C.D., Silva M.A.L.D. & Takiya C.M. 2006. Skin grafts in cutaneous oncology. *An. Bras. Dermatol.* 81 (5): 465-472.
- Lucas C., Criens-Poublon L.J., Cockrell C.T. & De Haan R.J. 2002. Wound healing in cell studies and animal model experiments by Low Level Laser Therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med. Sci.* 17 (2):110-134.
- Meller D., Pires R.T., Mack R.J., Figueiredo F., Heiligenhaus A., Park W.C. & Tseng S.C. 2000. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology.* 107 (5):980-989.
- Miraliakbari R. & Mackay D.R. 2006. Skin Grafts. *Operative Techniques in General Surgery.* 8 (4):197-206.
- Mohammadi A.A., Seyed J.S.M., Kiasat M., Tavakkolian A.R., Imani M.T., Ayaz M. & Tolide-Ie H.R. 2013. Effect of fresh human amniotic membrane dressing on graft take in patients with chronic burn wounds compared with conventional methods. *Burns.* 39 (2):349-353.
- Nakamura T., Endo K.I., Cooper L.J., Fullwood N.J., Tanifuji N., Tsuzuki M. & Kinoshita, S. (2003). The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (1):106-116.
- Niknejad H., Paeini-Vayghan G., Tehrani F.A., Khayat-Khoei M. & Peirovi H. 2013. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta.* 34 (4):340-345.
- Oliveria O.J. 2013. Análise de correspondência. Belém/UFPA: 15p.
- Pavletic M.M. Tegumento. 2007. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3rd ed. Barueri. 20: 250-258.
- Peplow P.V., Chung T.Y. & Baxter G.D. 2010. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed. Laser Surg.* 28 (3):291-325.
- Posten W., Wrone D.A., Dover J.S., Arndt K.A., Silapunt S. & Alam M. 2005. Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.* 31(3):334-340.

- Robson M.C. & Krizek T.J. 1973. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann. Surg.* 177(2):144-149.
- Rocha J.C.T. 2004. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *Rev. Bras. Promoç. Saúde.* 17 (1):44-48.
- Schindl A., Schindl M., Pernerstorfer-Schön H., & Schindl L. 2000. Low-intensity laser therapy: a review. *J. Investig. Med.* 48 (5):312-326.
- Subrahmanyam M. 1995. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. *Br. J. Plast. Surg.* 48 (7):477-478.
- Toda A., Okabe M., Yoshida T., Nikaido T. 2007. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *JPS.* 105 (3):215-219.
- Tong T. & Simpson D.J. 2012. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. *J. Small Anim. Pract.* 53(9): 520-525.
- Trelles M.A., Mayayo E., Miro L., Rigau J., Baudin G. & Calderhead R.G. 1989. The action of low reactive Level Laser Therapy (LLLT) on mast cells: a possible relief mechanism examined. *Laser Ther.* 1 (1):27 -30.
- Whinfield A.L. & Aitkenhead I. 2009. The light revival: does phototherapy promote wound healing? A review. *The Foot* 19 (2):117-124.

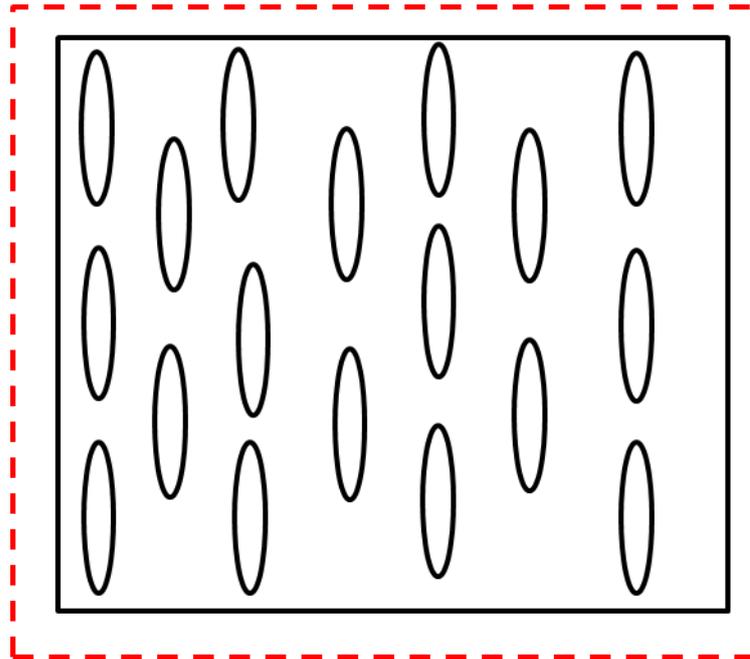
## APÊNDICES



**Apêndice A.** Esquema representativo da colocação da membrana e do enxerto na área da ferida. A porção azul representa a ferida, seguida do posicionamento da membrana (verde) e da colocação do enxerto cutâneo (azul claro, pontos pretos). Jaboticabal, 2015.

Avaliação Macroscópica dos Enxertos											
Dia da avaliação		N. Coelho									
Dia da cirurgia											
Edema		Quantidade da Secreção									
Ausente		Ausente									
Moderado		Moderado									
Intenso		Intenso									
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Coloração do enxerto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pálido</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Rósea</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Escuro</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Coloração do enxerto		Pálido		Rósea		Escuro	
Coloração do enxerto											
Pálido											
Rósea											
Escuro											
Anotar sobre presença de tecido desvitalizado, deiscência de sutura e aspecto da secreção											
Obs: _____											
_____											
_____											

**Apêndice B.** Ficha de avaliação macroscópica da ferida contendo os parâmetros a serem analisados pelo avaliador nos dias 3, 7 e 15 do pós-operatório. Jaboticabal, 2015.



**Apêndice C.** Esquema representativo da coleta da amostra para análises microscópicas. Notar que a área pontilhada em vermelho representa a incisão do tecido contendo uma pequena porção de pele original e toda a porção do enxerto. Jaboticabal, 2015.

Ficha de avaliação Histopatologia	
N. Lâmina:	
<b>Inflamação</b>	Predominância celular: _____
Ausente	
Discreta	Localização: _____
Moderada	
Acentuada	
<b>Relação Enxerto x Pele</b>	<b>Necrose</b>
Íntegro	Ausente
Degenerado	Discreto
	Moderado
	Acentuada
<b>Reepitelização</b>	
Ausente	
Discreto	
Moderado	
Acentuada	

**Apêndice D.** Ficha de avaliação microscópica das lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.

## Apêndice E. Instruções para autores Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

**NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (*paper charge*) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.**

**1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

**2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:**

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entre-linha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que

possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores.** Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas.** Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.