

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES ONDAS DE LASER E
ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA EPITELIZAÇÃO DE
ENXERTOS CUTÂNEOS APLICADOS EM FERIDAS RECÉM
CRIADAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Nazilton de Paula Reis Filho

Médico Veterinário

2019

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES ONDAS DE LASER E
ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA EPITELIZAÇÃO DE
ENXERTOS CUTÂNEOS APLICADOS EM FERIDAS RECÉM
CRIADAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Nazilton de Paula Reis Filho

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

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

2019

R376c

Reis Filho, Nazilton de Paula

Comparação entre diferentes ondas de laser e óleo de girassol ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Nazilton de Paula Reis Filho. -- Jaboticabal, 2019

78 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andriago Barboza De Nardi

1. Cirurgia. 2. Pele enxerto. 3. Terapia com luz de baixa intensidade. 4. Ozônio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES ONDAS DE LASER E ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA EPITELIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS APLICADOS EM FERIDAS RECÉM CRIADAS DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTOR: NAZILTON DE PAULA REIS FILHO

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / Unesp - Jaboticabal



Profa. Dra. ANA LUCIA DE CARVALHO ROSA PASCOLI

Universidade Regional de Blumenau-FURB / Blumenau/SC



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Médica Veterinária Autônoma ROBERTA CARVALHO BASILE

Área de Reabilitação Animal / Araraquara/SP

Jaboticabal, 29 de janeiro de 2019

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. 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 e concluído em Agosto de 2015. No mesmo mês ingressou no Programa de Doutorado na mesma Instituição. Em Setembro de 2015 passou a fazer parte do corpo docente do Curso de Medicina Veterinária nas Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO/SP), onde é responsável pelas disciplinas de Técnica Cirúrgica, Patologia Cirúrgica e Oncologia Veterinária, além de orientar no Programa de Aperfeiçoamento em Medicina Veterinária na área de Cirurgia de Pequenos Animais. Ainda nas FIO, é responsável pelo Setor de Cirurgia no Hospital Veterinário Roque Quagliato. Ministrou diversas palestras e aulas durante o período de residência, mestrado e de doutorado abordando temas relacionados às áreas de Cirúrgica de Pequenos Animais e de Oncologia Veterinária. Atualmente, é também Professor no Instituto Qualittas de Pós-graduação na área de Oncologia Veterinária.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra à mulher guerreira, que ao completar seu meio século de vida, também me viu nascer. Que me proporcionou tardes e tardes de boa conversa, risadas e carinho. Um lindo exemplo de batalha e perseverança, que jamais mediu quaisquer esforços para me agradar. Obrigado por todos os valores ensinados e por todo amor recibo. Obrigado minha querida avó Yvone Rotondaro das Chagas.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é uma espécie de dívida a ser paga sem nenhum envolvimento material. Gratidão é para ser um sentimento puro em troca de gentilezas que também vieram do coração. Por isso, convido o leitor a apreciação desta parte da obra, senão uma das mais importantes do todo.

Dou início aos meus agradecimentos direcionando-os à Deus, pois somente o poder divino é capaz de proporcionar tantas graças alcançadas durante este período. Agradeço por toda proteção, zelo e por me guiar nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador que, confiou no meu trabalho, me guiou nas minhas dúvidas e pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou. Prof. Andriago, grande exemplo de competência, dedicação ímpar, humildade e generosidade. Esses são atributos que normalmente não se misturam, mas que somente são possíveis de se encontrar juntos em uma pessoa especial como o Senhor. Obrigado por todos esses anos de parcerias e trabalho, mas que desejo ser apenas uma pequena fração do que vem pela frente.

Para concretização deste trabalho, tive fundamental suporte de pessoas provenientes de duas instituições. A primeira, a Unesp de Jaboticabal, agradeço por se tornar uma das minhas casas de formação profissional. Foram professores, funcionários, estudantes de graduação e pós-graduação, e tutores de animais que, desde 2014 até agora, foram grandes pilares para a construção do meu sonho. A segunda, a Faculdade Integradas de Ourinhos, instituição que me deu a oportunidade de aprender a profissão que escolhi para minha vida, ser Professor. Obrigado pelo apoio e até mesmo por ceder o espaço físico para o desenvolvimento do meu projeto. Tenho orgulho de fazer parte da equipe com tantas pessoas de competência.

O que não faltam são pessoas para colocar nessa lista de agradecimentos. Primeiramente aqueles que ajudaram diretamente no projeto: Marília, Ana Pascoli, Igor, Rafaela, Rafael (Iepo), Stephanny, Josiane, Beatriz Floriano, Laís, Bruno, Beatriz Bitto, Mariana Palma, Guilherme, Sandra, Daniela Ribas, Roberta Basile, Daniela Montechiesi, Prof. Ferraudó, Prof. Rosemeire, Prof. Paola. Tenho a felicidade de

ressaltar que muitos destes citados acima fazem parte de um grupo especial de amigos próximos. Porém existem aqueles que, apesar de não contribuírem de forma direta, estiveram sempre presentes nesta fase. André Tobias, Mariana Itimura, Bruno Elias, Cynthia, André Gonçalves, Guilherme Matteucci, Julielton Barata, Bruno (Xambs), Paulo Jark, todo o pessoal do SOV/FCAV, Fernanda Saules, Renata Rossetti, Raquel Queiroz, Mariana Tiai, Marcel, Vinícius, Suelen Lovarato e todo o pessoal da “Galera de Bandeirantes”.

Quero também agradecer minha família, iniciando pelos meus cunhados Gregório, Fabiane, Fernanda e Edvar, minha sogra Sônia, meus tios Raul e Rodrigo, meus primos Rodrigo e Isis, minha avó Yvone.

Enfim, a parte final e mais difícil dos meus agradecimentos vai para minha mãe, minha esposa e meu filho. Como dito no início desta sessão, se agradecer é dívida então, vocês três representam somatória simplesmente impagável. Nos conhecemos em três momentos distintos da minha vida: 1988 (meu nascimento), 2008 (início de namoro) e final de 2009 (nascimento do Heitor). E hoje, aos 30 anos, percebo que sou inteiramente completo. Não é coincidência, sou completo pois sou composto por três partes iguais que foram se juntando e me crescendo até chegar no que sou hoje. Minha mãe, Raquel, é o alicerce, que no sentido literal significa “base sobre o qual se assentam as estruturas externas da construção”, você é a responsável pela minha base ser composta de carinho, amor, valores e alegria. Tenho muito orgulho de ter sido gerado no ventre de uma mulher de tamanha garra. Minha esposa Carla, o amor da minha vida, representa as paredes pois, afinal, foi a pessoa que se dispôs a caminhar junto a mim com cumplicidade, lealdade, respeito e doçura. A você Carla, como diria o Poetinha (Vinicius de Moraes) com o Tom (não eu, mas o Jobim) tocando piano ao fundo: “De tudo, meu amor serei atento / Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto / Que mesmo em face do maior encanto / Dele se encante mais meu pensamento”. Meu filho Heitor é a janela de uma bela paisagem, o colorido dos quadros que enfeitam a parede, a graça, o tempero da vida. É a parte de mim que eu mais gosto. Hoje, sinto que é injusto a palavra amor possuir uma única definição pois, em mim, o amor tem outro sentido depois de você ter chegado filho. Assim, minhas três partes me fazem um só. Serei eternamente grato a vocês.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.2 Objetivos específicos	2
2. Revisão de Literatura	2
2.1 Sistema tegumentar.....	2
2.2 Enxerto cutâneo.....	5
2.3 Laser de Baixa Intensidade (LBI).....	8
2.4 Ozonioterapia.....	11
3. Referências	13
CAPÍTULO 2 – Comparação entre as ondas contínua e pulsada do laser de baixa intensidade (LBI) na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	20
RESUMO	20
Introdução	20
Material e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	28
Conclusão	38
Referências.....	39
CAPÍTULO 3 – Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) e do óleo de girassol ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas de coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	42
RESUMO	42
Introdução	42
Material e Métodos.....	43
Resultados e Discussão.....	48
Conclusão	60
Referências.....	60
APÊNDICES.....	64

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

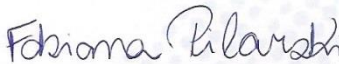


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Comparação entre diferentes frequências de laserterapia e óleo ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicado em feridas recém criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**”, protocolo nº 03286/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de março de 2018.

Vigência do Projeto	02/04/2018 a 07/12/2018
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Nº de animais	40
Peso / Idade	3,5 kg / 4 a 8 meses
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Biotério da Unesp Botucatu

Jaboticabal, 08 de março de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES ONDAS DE LASER E ÓLEO DE
GIRASSOL OZONIZADO NA EPITELIZAÇÃO DE ENXERTOS CUTÂNEOS
APLICADO EM FERIDAS RECÉM CRIADAS DE COELHOS (*ORYCTOLAGUS
CUNICULUS*)**

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 saudável. Objetivou-se com este trabalho foi comparar diferentes ondas do laser de baixa intensidade e do óleo de girassol ozonizado como potenciais estimulantes da cicatrização em enxertos aplicados em feridas sem tecido de granulação em coelhos. Para isso, foram elaborados dois experimentos onde o primeiro comparou a laser de baixa intensidade (LBI) de onda contínua com a LBI pulsada (Capítulo 2), no qual 31 coelhos foram distribuídos em três grupos, grupo controle (GC), grupo laser onda contínua (GLC) e grupo laser onda pulsada (GLP). O segundo experimento comparou a LBI de onda contínua com a aplicação tópica de óleo de girassol ozonizado (OGO) (Capítulo 3) e 32 coelhos também foram distribuídos em três grupos, sendo grupo controle (GC), grupo laser (GL) e grupo ozônio (GO₃). No primeiro experimento, os grupos GLC e GLP apresentaram evolução semelhante, com processo cicatricial satisfatório do enxerto em ambos, ao contrário do grupo GC. Tais resultados se mantiveram na avaliação microscópica, pois o GC apresentou correlação significativa com critérios ligados à falha do enxerto. Já no segundo experimento, novamente ficou comprovado a ineficácia do leito doador sem tecido de granulação em proporcionar ambiente ideal para cicatrização dos enxertos. Os grupos GL e GO₃ apresentaram evolução superior comparado ao GC, embora tenha ocorrido maceração nos enxertos dos animais do que receberam OGO, interferindo negativamente no processo de revascularização.

Palavras-chave: cicatrização, enxertia, laserterapia, ozonioterapia.

**COMPARISON BETWEEN DIFFERENTS WAVES OF LOW LEVEL LASER
THERAPY AND OZONIZED SUNFLOWER OIL IN EPITHELIZATION OF SKIN
GRAFTS APPLIED IN RABBIT FRESH WOUNDS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)**

ABSTRACT - Cutaneous grafting is a simple and useful surgical technique for the repair of wounds, especially in which there is a difficulty in applying the primary closure, or other reconstructive technique. However, for graft survival, it is necessary a healthy granulation tissue in the wound bed. The aim of this study was to compare differents waves of low level laser therapy (LLLT) and ozonated sunflower oil as potential healing stimulators in grafts applied rabbits in fresh wounds. Two trials were carried out in which the first one compared LLLT continuous wave with LLLT pulsed (Chapter 2) in 31 rabbits divided into three groups: control group (CG), continuous wave laser group (GLC) and pulsed wave laser group (GLP). The second trial compared LLLT continuous with ozonized sunflower oil (OGO) (Chapter 3), and 32 rabbits were also divided into three groups, being control group (GC), laser group (GL) and ozone group (GO₃). In the first trial, the GLC and GLP groups showed similar evolution, with a satisfactory healing process in both, unlike the CG group. These results were maintained in the microscopic evaluation since the GC showed a significant correlation with criteria related to graft failure. In the second trial, the ineffectiveness of the donor bed without granulation tissue to provide an ideal environment for healing of the grafts was again demonstrated. The GL and GO₃ groups presented superior evolution compared to the CG, although maceration occurred in the grafts of the animals that received OGO, have a negative effect on the revascularization process.

Keywords - healing, skin grafting, lasertherapy, ozone therapy.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

Certa vez considerada um pequeno nicho na Medicina Veterinária, a cirurgia plástica reparadora é, sem dúvidas, uma das áreas de maior expansão nas últimas décadas (Pavletic, 2010). Tal fato se justifica, pois, o manejo de feridas e a síntese de grandes defeitos cutâneos são desafios frequentes encontrados na prática clínica de pequenos animais. As técnicas para lidar com esses desafios envolvem ciência e arte, em que o cirurgião deve possuir a compreensão para que seus esforços resultem tanto em resultado estético aceitável quanto funcional (Kirpensteijn e Haar, 2013).

Historicamente, o tratamento de feridas na Medicina Veterinária, limitava-se a manejos visando a cicatrização por segunda intenção ou, ainda, técnicas reparadoras relativamente simples (Williams e Fowler, 1999). Era comum a realização de técnicas reparadoras em etapas, aguardando-se inicialmente a colagenização da ferida e, somente então, a área aberta se tornava apta a receber um fragmento de pele (Pavletic, 1981). Somente após a descrição dos retalhos de padrão axial na Medicina Veterinária é que foi possível a síntese de grandes defeitos, sem necessidade de se aguardar a revascularização local (Pavletic, 1990).

Embora tenha ocorrido esse avanço notável, o cirurgião veterinário ocasionalmente se depara com feridas que não podem ser reaproximadas de forma primária ou mesmo com o uso de retalhos de padrões subdérmicos e axiais. Estas são mais frequentemente localizadas nas extremidades distais, além do alcance dos possíveis retalhos. Portanto, várias técnicas de enxertia cutânea têm sido extrapoladas da cirurgia plástica humana para abordar tais situações (Scharf, 2017). No entanto, em recente editorial, o médico Bayne (2016) analisou um estudo retrospectivo realizado por Riggs et. al (2015) sobre a evolução clínica de enxertos cutâneos em cães e gatos. Fica claro, por meio deste documento, que as diferenças fisiológicas e anatômicas entre as espécies fundamentam os resultados opostos. Uma das diferenças mais relevantes é a necessidade da aplicação do enxerto sobre tecido de granulação saudável, em cães e gatos, para que este então proporcione nutrição adequada ao enxerto até sua revascularização (Fowler, 2006).

1.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese foi avaliar se o uso laser de baixa intensidade em diferentes configurações e o óleo de girassol ozonizado contribuem para a epitelização de enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) aplicados em feridas sem a presença de tecido de granulação.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cicatrização de enxertos cutâneos em coelhos sem a presença de tecido de granulação no leito receptor;
- Analisar o potencial estimulante do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização;
- Comparar a eficácia entre o laser de baixa intensidade emitido em ondas contínuas e pulsada como estimulante de cicatrização em enxertos cutâneos;
- Analisar o potencial estimulante do óleo de girassol ozonizado no processo de cicatrização;
- Comparar a eficácia entre o laser de baixa intensidade emitido em ondas contínuas e óleo de girassol ozonizado como estimulante de cicatrização em enxertos cutâneos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Sistema tegumentar

O sistema tegumentar é o maior órgão do corpo representando 24% do peso corporal de um filhote, mas apenas 12% de um cão adulto. A pele é parte essencial deste sistema, sendo receptor sensorial para o toque, pressão, vibração, calor e frio. Dentre suas múltiplas funções, pode-se incluir a produção de vitamina D, termorregulação, armazenamento de água, gordura, eletrólitos, carboidratos e proteínas; além de agir como barreira contra produtos químicos e radiação, traumas e infecções externas (Pavletic, 2018).

Pode-se dividir a pele em duas camadas: a camada epitelial é denominada epiderme, e a camada conjuntiva chamada de derme. O subcutâneo sustenta a derme e é composto por gordura e camada fibrosa (Campbell; Lichtensteiger, 2004; Paterson, 2008).

Basicamente, a epiderme é composta por epitélio escamoso estratificado queratinizado em sua superfície. Duas características importantes são que a epiderme é avascular e fina, muito embora sua espessura possa variar de acordo com o grau de queratinização, compatível com as quantidades de esforço mecânico e atrito os quais determinada porção será sujeitada. A epiderme, provida de pelos, é composta de 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 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 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).

A cicatrização é um processo biológico altamente coordenado que possui uma continuidade de eventos dos mais amplos aspectos. A cicatrização pode ocorrer por primeira intenção, quando não há perda de tecido e as extremidades da pele ficam justapostas; segunda intenção, ocorre em feridas com perda de tecido e as bordas ficam distantes; e por terceira intenção, na qual a ferida é inicialmente manejada como ferida aberta até que se tenham condições para realizar sua síntese cirúrgica (Dernell, 2006; Fahie; Shettko, 2007). Pode-se dividi-la em fase inflamatória, de proliferação e de maturação ou remodelamento. Entretanto, essa divisão é mais didática do que uma sucessão real de acontecimentos, pois há uma sobreposição considerável e variável destes eventos, uma vez que, na mesma ferida, as três fases podem estar presentes simultaneamente (Fahie; Shettko, 2007; Stanley; Cornell, 2018).

Na fase inflamatória, a hemostasia ocorre na tentativa de evitar a exsanguinação. A ativação da cascata de coagulação, a agregação e ativação plaquetária são eventos essenciais à interrupção da hemorragia e resultam na formação do coágulo de fibrina, que contribui na formação da matriz extracelular (MEC) provisória. Em seguida, a vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo para o leito da ferida ao mesmo tempo em que permite o extravasamento do plasma. Esses eventos culminam nos sinais típicos da inflamação: calor, vermelhidão, edema e dor. Inicialmente há migração de grandes neutrófilos, mas após 48 a 72 horas, os monócitos circulantes que chegaram na ferida junto com os neutrófilos, sofrem ação do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e se diferenciam em macrófagos. Esses serão essenciais nas fases subsequentes, pois regulam a liberação de substâncias sinalizadoras para o recrutamento de outros tipos celulares importantes, tais como fagocitar bactérias e debris, além de liberarem metaloproteinases responsáveis por degradar a MEC (matriz extracelular) provisória e facilitar a migração de células para a ferida na fase proliferativa (Hosgood, 2006; Abdelrahman; Newton, 2011; Stanley; Cornell, 2018).

A fase proliferativa é marcada pelos seguintes eventos: angiogênese, fibroplasia e epitelização. A angiogênese caracteriza-se pela formação de novos vasos a partir de capilares pré-existentes ao redor da ferida. Na fibroplasia, células mesenquimais quiescentes se diferenciam em fibroblastos, responsáveis por sintetizar os principais componentes de MEC definitiva como colágeno I e III, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina e fibronectina. Com a síntese de MEC definitiva, há a formação do tecido de granulação, um tecido vermelho brilhante que serve como uma barreira natural contra contaminação e também como superfície para a epitelização. Por fim, na epitelização, a atividade das células epiteliais leva à inibição da formação de tecido de granulação, se proliferando continuamente até que haja o contato entre as células das bordas opostas, o que cessa o processo (Abdelrahman; Newton, 2011; Stanley; Cornell, 2018).

A maturação consiste na última fase do reparo da ferida e tem como função promover fortalecimento do tecido, propiciando barreira física contra agressões por meio da reorientação das fibras de colágeno e maturação das camadas epidérmicas. O colágeno é, inicialmente, depositado na ferida de forma desorientada e a medida

em que a ferida sofre tensão e contração, ocorre seu alinhamento. Na maturação, há a substituição do colágeno do tipo III pelo tipo I que irá conferir rigidez, porém, não na mesma proporção do tecido antes de ser lesionado, mas cerca de 70 a 80% da força inicial (Fahie; Shettko, 2007; Abdelrahman; Newton, 2011; Stanley; Cornell, 2018).

2.2 Enxerto cutâneo

Enxertos cutâneos livres são segmentos de pele completamente desinseridos de determinada área do corpo e utilizados para recobrir uma superfície desprovida de cobertura epitelial (Pavletic, 2018). Ao contrário dos retalhos, os enxertos não possuem uma ligação vascular após sua transferência e, portanto, dependem inteiramente do desenvolvimento de conexões venosas que se desenvolvem com o leito receptor (Scharf, 2017; Pavletic, 2018).

O objetivo do enxerto de pele é o de reestabelecer barreira cutânea, sobretudo, em defeitos que não podem ser reconstituídos por justaposição direta ou por retalho de pele devido a sua localização, como em regiões distais dos membros (Swain, 1990; Fowler; Shettko, 2006; Pavletic, 2010). Sua utilização é uma opção interessante e proporciona modo efetivo para restaurar ou reparar feridas, desde que preservados os princípios de vascularização, antissepsia e hemostasia (Pavletic, 2010).

Existem várias classificações de enxertos de pele, principalmente baseadas na origem do enxerto e na sua espessura. De acordo com o doador, os enxertos podem ser classificados em auto-enxertos ou enxertos autógenos, desde que o segmento receptor e doador provenha do mesmo animal; aloenxertos ou homoenxertos quando o segmento receptor e doador provém da mesma espécie; xenoenxertos ou heteroenxertos quando provém de espécies diferentes (Swaim, 1990; Teixeira Neto et. al, 2010) ou ainda, isoenxertos quando o doador é irmão idêntico ou entre híbridos F1 produzidos pelo cruzamento de linhagens endogâmicas. Do ponto de vista clínico, os auto-enxertos são aqueles com melhores resultados e são utilizados como enxertos permanentes (Swaim, 1990; Teixeira Neto et. al, 2010; Bohling; Swaim, 2018).

Conforme a espessura, podem ser classificados em total ou parcial. O enxerto de pele total, inclui a epiderme e a totalidade da derme, camada papilar e reticular,

enquanto o enxerto de espessura parcial, é aquele que contém epiderme e espessura variável da derme (Swain, 1990; Teixeira Neto et. al, 2010; Stanley; Cornell, 2018). Os enxertos de espessura total apresentam algumas vantagens quando comparados com os de espessura parcial. Possuem todos os componentes secundários responsáveis pela cicatrização semelhante aos da pele original, promovendo, assim, o crescimento de pelos e sendo capaz de suportar traumatismos tão bem quanto a pele normal circundante. Os enxertos de espessura total também mantêm as estruturas anexas e função glandular e pilosa preservadas, não se fazendo necessário o uso de instrumentais específicos para a sua coleta (Fowler, 2006; Ratner, Skouge, 1998; Stanley et. al, 2013). Ainda, oferecem boa coloração e textura ao local receptor e são caracterizados por apresentarem contração mínima da ferida (Ratner, Skouge, 1998). Porém, apresentam desvantagens quanto ao grau de expansão, em virtude de serem pouco flexíveis e menos adaptáveis, quando comparados aos enxertos de espessura parcial (Pavletic, 2010, Stanley; Cornell, 2018).

Os enxertos parciais ou laminares também são compostos por epiderme, mas a porção da derme é variável e, assim, são denominados como delgados, intermediários e espessos (Andreassi et. al, 2005; Swaim, 2007). Os enxertos de espessura parcial são mais facilmente obtidos, entretanto, as principais desvantagens são: maior fragilidade, crescimento piloso inadequado, maior contração, a coleta exige materiais específicos como dermatomo, proporcionam reparação tecidual pobre, visto que a pele é fina, frágil e sujeita à retração pela ausência de componentes de derme (Stephenson, 2005; Scharf, 2017).

O enxerto somente deve ser aplicado quando houver, no leito receptor, a presença de tecido de granulação saudável ou sobre superfície “fresca” isenta de infecção e debris, que se encontre vascularizada o bastante para produzir tecido de granulação (Hedlund, 2006; Swaim, 2007). Vale ressaltar, também, que deve existir quantidade adequada de pele do doador disponível para a coleta (Fowler, 2006). Pavletic (2018) relata que apesar de enxertos livres de pele necessitarem de leito receptor vascularizado para a sobrevivência, não é necessária a presença de tecido de granulação antes da aplicação do enxerto, porém estes apresentam melhor resultado quando a granulação está presente.

A sobrevivência inicial dos enxertos depende somente da absorção de fluídos e da qualidade do leito receptor, visto que são desprovidos de vascularização (Hedlund, 2006). Estes fluídos são, na verdade, plasma sanguíneo do leito receptor que, no primeiro momento, irão irrigar e nutrir os vasos dilatados do enxerto e, posteriormente, serão responsáveis pela neovascularização e anastomose vascular ao enxerto promovendo sua irrigação e sobrevivência (Siegfried et. al, 2005). Portanto, a gordura residual da face profunda do enxerto deve ser eliminada previamente à enxertia, com o auxílio de tesoura, para facilitar este processo (Lofêgo Filho et al., 2006; Scharf, 2017).

A degeneração do enxerto de pele tem início logo após a remoção do leito doador, e sua regeneração após o depósito no leito receptor. Neste momento inicial, os dois fenômenos ocorrem simultaneamente, sendo a regeneração mais lenta que a degeneração. Somente no 7º a 8º dia de pós-operatório que esses eventos se contrapõem (Tanner et. al, 1964; Birch; Branemark, 1969; Swain, 2007).

Swaim (1990) afirma que imediatamente após a enxertia, o enxerto aparece pálido, devido à deficiência de elementos hemáticos. Após 72 horas, inicia-se a reorganização vascular e, após cinco ou seis dias, o enxerto irá começar a apresentar coloração rosa claro, decorrente do restabelecimento circulatório normal. Neste período se não apresentar reorganização vascular, não se tornará mais viável (Hedlund, 2006; Stanley; Cornell, 2018).

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 por meio de uma rede de fibrina que adere ao leito receptor e ocorre retração dos filamentos de fibrina tracionando o enxerto até que ocorra íntimo contato entre doador e receptor. A rede de fibrina é convertida em tecido fibroso entre o enxerto e o leito receptor por meio da invasão de fibroblastos, leucócitos e fagócitos. Esse tecido inicia sua resistência e proporciona força de aderência a partir de 8 horas da sua aplicação, até o décimo dia de pós-operatório (Chick, 1988; Hierner et. al, 2005; Stanley; Cornell, 2018).

A fase de embebição plasmática corresponde ao espasmo vascular das bordas seccionadas do enxerto, no momento de sua retirada do leito doador, e eliminação de soro (composto por eritrócitos, leucócitos polimorfonucleares e isento de fibrinogênio)

pelas bordas do leito receptor. Esse líquido se acumula no leito da ferida e é absorvido pelo enxerto por ação capilar após vasodilatação, iniciada no momento da aplicação. Além de nutrir o enxerto, irá causar edema, que atinge seu ponto máximo por volta de 48 a 72 horas. Neste momento a circulação é reestabelecida (Chick, 1988; Andreassi et. al, 2005; Hierner et. al, 2005; Swain, 2007; Stanley; Cornell, 2018).

Na sequência, pequenos capilares se anastomosam, comunicando a superfície do enxerto ao leito receptor, sendo tal processo conhecido como fase inosculatória. O enxerto encontra-se ainda fragilmente fixado, podendo estar cianótico. O surgimento e proliferação de novos vasos é que irá garantir a sobrevivência da pele transplantada. Do quinto ao sétimo dia de pós-operatório, ocorre a fase de neoangiogênese, quando o fluxo sanguíneo verdadeiro ocorre (Franco; Silva, 2002; Golcman; Golcman, 2002). Pode, também, ocorrer a revascularização pelo crescimento de novos vasos do leito para dentro do enxerto, por meio de brotamento endotelial. A incorporação do enxerto depende do estabelecimento de conexões arteriais e de drenagem adequada, que deve ocorrer por volta do 7º ou 8º dia de pós-operatório (Scharf, 2017).

2.3 Laser de Baixa Intensidade (LBI)

O laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é um dos recursos fototerapêuticos mais utilizados na Medicina, em uma ampla gama de possibilidades. Existem três propriedades que caracterizam seu funcionamento: monocromaticidade, responsável pelo comprimento de onda único a cada emissão; colimação, ou seja, a transmissão da luz em única direção, sem divergência, e a coerência, incumbida pela emissão de todas as ondas de luz na mesma fase (Hawkins; Abrahamse, 2005).

O comprimento da onda de luz e sua potência de emissão são responsáveis pelo tipo de laser emitido. Comprimentos entre 400 nm a 700 nm (nanômetros) correspondem à luz visível, enquanto, aqueles acima de 700 nm são invisíveis ou infravermelhos. Como o comprimento corresponde à distância entre dois picos de onda, pode-se dizer que sua relação com a frequência de emissão é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o comprimento da onda menor a frequência (Tuner; Hode, 2010; Agne, 2013). Tais informações são clinicamente relevantes pois

há uma variação do comprimento de onda de acordo com o tipo de célula ou tecido que irá absorver o laser. A potência da emissão do laser também é significativa, pois influencia diretamente o efeito tecidual que se deseja produzir. Desta forma, o laser medicinal pode ser dividido em três categorias, alta, média e baixa potência (Hawkins; Abrahamse, 2005; Tuner; Hode, 2010; Agne, 2013).

O laser de baixa intensidade (LBI) possui vários benefícios clínicos, incluindo a promoção da cicatrização de feridas, consolidação de fraturas e, até mesmo, alívio dos sinais de dor. Portanto, a LBI ou baixa potência, causa a penetração da luz na superfície do tecido de forma não invasiva (Matić et. al, 2002) e, 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).

Os mecanismos de ação da LBI podem ser divididos em três categorias. A reação primária corresponde à absorção dos fótons e absorção pelas mitocôndrias e membranas plasmáticas das células atingidas. 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). A reação secundária é uma extensão da reação primária, caracterizada pela liberação do cálcio da mitocôndria para o citoplasma, estimulando o metabolismo celular e a regulação das vias de sinalização responsáveis por estímulo na migração, síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), mitose, síntese de proteínas e proliferação. Por fim, a reação terciária corresponde ao reflexo sistêmico da LBI, pois as células irradiadas estabelecem comunicação intercelular com aquelas que não foram atingidas pelos fótons, gerando incremento do sistema imune e liberação de substâncias ligadas ao controle da dor (Hawkins; Abrahamse, 2005; Dyson, 2006).

A LBI é uma modalidade terapêutica que permite ampla diversificação em sua aplicação. Parâmetros como comprimento de onda e dose, podem ser facilmente alterados nos equipamentos que emitem o laser e, desta forma, ajustados de acordo com a situação presente. Contudo, ao mesmo tempo que, tal flexibilidade garante

ampla utilização da LBI, a falta de padronização destes acaba gerando resultados conflitantes e, até mesmo, dúvida a respeito de sua eficácia (Ilic et. al, 2006; Hashmi et. al, 2010; Prado et. al, 2012; Mat et. al, 2018).

A forma da emissão da luz é outra variável da LBI que carece de consensos. Basicamente, a emissão contínua emite mesma quantidade de luz durante determinado período. Já a pulsada, possui pequenos intervalos de ausência de emissão de luz, denominados “*quench periods*”. Não há concordância se a emissão de luz de forma contínua ou onda pulsada é mais adequada para as várias aplicações de laserterapia. No entanto, aparentemente a LBI pulsada é capaz de penetrar em tecidos mais profundos sem provocar aumento de temperatura nas camadas mais superficiais. Tal característica faz com que a terapia pulsada alcance densidades de picos de potência muito maiores e mais seguros ao tecido receptor quando comparada a LBI contínua (Ilic et al., 2006; Hashmi et al., 2010).

Clinicamente, a LBI possui efeitos como a redução da dor de grandes variedades 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).

Na Medicina, a LBI é frequentemente utilizada no tratamento de artrites, lesões lombares, traumas cutâneos e lesões de tecidos moles em geral (Woodruff et al., 2004). Além disso, já foram observadas redução do edema e inflamação associada com lesões agudas em músculos superficiais, tendões, ligamentos, bursas e bainhas (Hawkins; Abrahamse, 2005). Talvez, uma ação de seus efeitos mais conhecidos seja a melhora da cicatrização de feridas de evolução lenta ou retardada (Kubota, 2004; Woodruff et al., 2004).

Na Medicina Veterinária, seu uso tem sido cada vez mais difundido. Lucroy et. al (1999) aplicaram a LBI em um cão utilizando transdutor de 630 nm de comprimento de onda com dose de 5 J / cm², durante quatro dias consecutivos, em ferida que

possuía 8 meses de evolução, sendo que essa modalidade de tratamento proporcionou cicatrização completa em 21 dias. Um outro estudo utilizou a LBI após hemilaminectomia para tratamento doença do disco intervertebral em cães, tendo os animais tratados voltado a deambular mais precocemente (Draper et. al, 2012). No entanto, recentemente em estudo controlado, randomizados e em teste duplo cego, não encontrou diferença estatística no tratamento com LBI em defeitos cutâneos, criados experimentalmente em cães (Kurach et al., 2015).

2.4 Ozonioterapia

O ozônio (O_3) é uma molécula constituída por três átomos de oxigênio em uma estrutura dinamicamente instável por causa da presença do efeito mesomérico. Em estado gasoso, é incolor, apresenta odor acre e é explosivo, nos estados líquido e sólido. O O_3 possui meia vida de 40 minutos a $20^\circ C$ e 140 minutos a $0^\circ C$. Basicamente, a função do ozônio é a proteção da atmosfera contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta, ou seja, este gás está normalmente presente na superfície da terra em concentrações inofensivas, cerca de $20 \mu g / m^3$ (Bocci, 2006; Elvis; Ekta, 2011).

Embora a migração da O_3 para o campo médico date do século XIX, seu valor medicinal é, atualmente controverso (Smith et al., 2017). Apesar das suspeitas, uma infinidade de terapias baseadas em O_3 mostraram benefícios substanciais que abrangem grande variedade de doenças agudas e crônicas. O O_3 é atualmente, prevalente em odontologia para tratar uma série de doenças orais (Azarpazhooh; Limeback, 2008). Também, é conhecido que esse gás se mostrou benéfico como desinfetante para água potável e esterilização de instrumentos cirúrgicos (Elvis; Ekta, 2011).

O uso do gás ozônio como terapia na medicina alternativa tem atraído ceticismo devido à sua estrutura molecular instável. Contudo, volumes copiosos de pesquisa forneceram evidências de que as estruturas de ressonância dinâmica do O_3 facilitam as interações fisiológicas, úteis no tratamento de uma diversidade de enfermidades. Especificamente, a terapia com O_3 induz estresse oxidativo moderado ao interagir com

lipídios. Essa interação aumenta a produção endógena de antioxidantes, a perfusão local e a entrega de oxigênio, bem como melhora da imunidade (Smith et al., 2017).

Contudo, o O₃ tem sido aplicado em uma ampla gama de utilização, como, processos infecciosos (cistites, prostatites, metrites), controle de dor articular, inflamações e tratamento de feridas (Martinez-Sanches et. al, 2005; Elvis; Ekta, 2011). Embora, na Medicina Veterinária, os estudos ainda sejam escassos, os poucos resultados representam futuro promissor (Li et al., 2007).

O mecanismo de ação do gás O₃ é extremamente complexo e ainda muito pouco elucidado. Sabe-se que, de forma resumida, esse gás tem potencial antioxidante, de modulação vascular e hematológica, de inativação de patógenos e de ativação do sistema imune (Bocci, 2006; Elvis; Ekta, 2011).

Uma cascata endógena, multifacetada, é iniciada e libera substratos biologicamente ativos em resposta ao transiente, e moderado, estresse oxidativo que o O₃ induz quando um indivíduo é exposto ao tratamento com o gás. Isso ocorre pela alta taxa de dissolução no componente aquoso do plasma sanguíneo. Alguns destes antioxidantes são o superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione S-transferase (GST), a catalase (CAT), o heme oxigenase-1 (HO-1), a NADPHquinona-oxirredutase (NQO-1), as proteínas de choque térmico (HSP), e a fase II de enzimas do metabolismo de fármacos. A maioria dessas enzimas age como sequestradoras de radicais livres, clinicamente relevantes para ampla variedade de doenças (Smith et al., 2017).

O O₃ é um estimulador do fluxo transmembrana de oxigênio (O₂), o que faz com que a cadeia respiratória mitocondrial seja mais eficiente. Se administrado de forma periódica, o O₃ pode gerar substâncias suficientes para alcançar a medula óssea atuando como estímulo sustentado à eritropoiese. Ademais, o O₃ é capaz de melhorar a circulação sanguínea e fornecimento de oxigênio para tecidos isquêmicos, por meio do aumento da estimulação da diferenciação de eritroblastos e atividade vasodilatadora (Smith et al., 2017).

Sobre sua ação em patógenos, o O₃ promove a inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários por meio da interrupção da integridade do envelope celular de bactéria pela oxidação dos fosfolípidos e lipoproteínas. Nos fungos, o O₃ inibe o crescimento celular, em determinados estágios. Já nos vírus, o O₃ danifica a

cápsula viral e interfere no ciclo reprodutivo, interrompendo o contato vírus-célula como resultado da peroxidação. Os revestimentos enzimáticos fracos, nas células que são vulneráveis à invasão por vírus, tornam-se suscetíveis à oxidação e eliminação pelo corpo, que então os substitui por células saudáveis (Bocci, 2006; Elvis; Ekta, 2011; Hashemi, et al., 2015).

O ozônio também ativa o ciclo de Krebs, aumentando a carboxilação oxidativa do piruvato, estimulando a produção de ATP (trifosfato de adenosina). Isso também causa uma redução significativa no NADH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido) e ajuda a oxidação do citocromo C. Existe uma estimulação da produção de enzimas que atuam como eliminadoras de radicais livres e protetoras de paredes celulares: glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase (Martinez-Sanches et al., 2005; Smith et al., 2017).

No sistema imunológico, o ozônio administrado em concentração de entre 30 e 55 $\mu\text{g} / \text{m}^3$ pode causar maior produção de interferons, fator de necrose tumoral e interleucina-2. A produção de interleucina-2 desencadeia toda uma cascata de reações imunológicas subsequentes (Hashemi, et al., 2015).

A administração do O_3 pode variar de acordo a intensão terapêutica e a localização da lesão. Basicamente, o tratamento pode ser realizado por exposição direta ao gás, ou por meio da utilização de substâncias ozonizadas, como óleo ou líquidos. A primeira, e mais popular, via de aplicação é a autohemotransusão. Entretanto, pode-se também citar a injeção direta intramuscular, intradiscal ou paravertebral; insuflação retal, nasal, oral, vaginal, vesical, pleural e peritoneal. Além disso, a exposição cutânea também tem sido relada com frequência por meia da selagem de parte do corpo em uma câmara ou saco e insuflando com mistura de O_2 - O_3 (FITZPATRICK et. al, 2017; Smith et al., 2017).

3. Referências¹

Abdelrahman T, Newton H (2011) Wound dressings: principles and practice. **Surgery (Oxford)** 29:491-495.

¹ Baseado em: NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE DISSERTAÇÃO E TESE DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP, CÂMPUS DE JABOTICABAL, versão 2018.

Agne JE (2013) Fototerapia In: Agne JE (Ed.) **Eletrotermofototerapia**. Santa Maria, p. 357-384.

Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'aniello C (2005). Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology** 23:332-33.

Azarpazhooh A, Limeback H (2008) The application of ozone in dentistry:a systematic review of literature. **Journal of Dentistry** 36:104-116.

Bayne D (2017) Full-thickness skin grafts in dogs and cats versus humans **Journal of the American Veterinary Medical Association** 248:43-48.

Birch J, Brånemark PI (1969) The vascularization of a free full thickness skin graft: I. A vital microscopic study. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery** 3:1-10.

Bocci VA (2006) Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research** 37:425-435.

Bohling MW, Swaim SF (2018) Skin grafts. In: Johnston SA, Tobias KM (Eds.) **Veterinary Surgery Small Animal**. St. Louis, p. 3952-4002.

Campbell KL, Lichtensteiger CA (2004) Structure and function of the skin. In: Campbell KL (Ed.) **Small Animal Dermatology Secrets**. Chile, p. 1-9.

Chick LRB (1988) History and biology of skin grafting. **Annals of Plastic Surgery** 21:358-365.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS (2007) Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and Laser Surgery** 25:102-106.

Dernell WS (2006) Initial wound management. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 36:713-738.

Draper WE, Schubert TA, Clemmons RM, Miles SA (2012). Low-level laser therapy reduces time to ambulation in dogs after hemilaminectomy: a preliminary study. **Journal of Small Animal Practice** 53:465-469.

Dyson M (2006) Primary, secondary and tertiary effects of phototherapy: a review. **Proceedings of Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers**. 6140:61-72.

Elvis AM, Ekta JS (2011) Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine** 2:66-70.

Fahie MA, Shettko D (2007) Evidence-based wound management: A systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 7:559-577.

Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ (2018) Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. **International Wound Journal** 9:1-12.

Fowler D (2006) Distal limb and paw injuries. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 36:819–845.

Franco D, Silva C. (2002) Enxertos, retalhos e implantes. In: Franco T (Ed.). **Princípios de Cirurgia Plástica**. São Paulo, p.87-106.

Gammel JE, Biskup JJ, Drum MG, Newkirk K, Lux CN (2018). Effects of low-level laser therapy on the healing of surgically closed incisions and surgically created open wounds in dogs. **Veterinary Surgery** 47:499-506.

Golcman B, Golcman R (2002) Principais tipos e indicações de enxertos. In: Gadelha AR, Costa, IM (Eds.). **Cirurgia Dermatológica em Consultório**. São Paulo, p.285-91

Hashemi M, Jalili P, et al. (2015) The effects of prolotherapy with hypertonic dextrose versus prolozone (intraarticular ozone) in patients with knee osteoarthritis. **Anesthesiology and Pain Medicine** 5:37-45.

Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR (2010). Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers In Surgery And Medicine** 42:450-466.

Hawkins D, Abrahamse H (2005) Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Therapy** 23: 251-259.

Hedlund CS (2006) Large Trunk Wounds. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 36:847–872.

Hierner R, Degreef H, Vranckx JJ, Garmyn M, Massagé P, Van Brussel M (2005) Skin grafting and wound healing the “dermato-plastic team approach”. **Clinics in Dermatology** 23:343-352.

Hosgood G (2006) Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 36:667-685.

Ilic S, Leichliter S, Streeter J, Oron A, DeTaboada L, Oron U (2006). Effects of power densities, continuous and pulse frequencies, and number of sessions of low-level laser therapy on intact rat brain. **Photomedicine and Laser Therapy** 24:458-466.

Kirpensteijn J, Haar GT (Eds.) (2013) **Reconstructive Surgery And Wound Management Of The Dog And Cat**. Barcelona, 240p.

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

Kunert P (1991) Structure and construction: the system of skin flaps. **Annals of Plastic Surgery** 27:509-518.

Kurach LM, Stanley BJ, Fritz M, Gazzola K, Seymour K, Hauptman J, Steficek B (2015) Effect of low-level laser therapy on the healing of open wounds in dogs. **Veterinary Surgery** 44:988-996.

Li JL, Yang YG, Zhang ZL, Nie SN, Li Z, Li F, Hua HY, Hu YJ, Zhang HS, Guo YB (2007) Protective effects of medical ozone combined with traditional Chinese medicine against chemically-induced hepatic injury in dogs. **World Journal of Gastroenterology** 13:5989-5994.

Lofêgo Filho JA, Dadalti P, Souza DCD, Souza PRCD, Silva MALD, Takiya CM (2006) Skin grafts in cutaneous oncology. **Anais Brasileiros De Dermatologia** 81:465-472.

Lucroy MD, Edwards BF, Madewell BR (1999) Low-intensity laser light-induced closure of a chronic wound in a dog. **Veterinary Surgery** 28:292-295.

Matić M, Lazetić B, Poljacki M, Duran V, Ivkov-Simić M (2002) Low level laser irradiation and its effect on repair processes in the skin. **Medicinski Pregled** 56: p. 137-141.

Paterson S (2008) Introduction - structure and function. In: Paterson S (Ed.) **Manual Of Skin Diseases Of The Dog And Cat**. Oxford, p.1-8.

Pavletic MM (1981) Canine axial pattern flaps, using the omocervical, thoracodorsal, and deep circumflex iliac direct cutaneous arteries. **American Journal of Veterinary Research** 42:391-402.

Pavletic MM (1990) Axial pattern flaps in small animal practice. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 20:105–125.

Pavletic MM (2010) The skin In: Pavletic MM (Ed.) **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. Iowa, p. 4-17.

Pavletic MM (Ed.) (2018) **Atlas Of Small Animal Wound Management And Reconstructive Surgery**. Iowa, 860p.

Prado RP, Garcia SB, Thomazini JA, Piccinato CE (2012). Effects of 830 and 670 nm laser on viability of random skin flap in rats. **Photomedicine And Laser Surgery** 30:418-424.

Ratner D, Skouge JW (1998) Surgical pearl: The use of free cartilage grafts in nasal alar reconstruction. **Dermatologic Clinics** 16:75-90.

Riggs J, Jennings JF, Friend EJ, Halfacree Z, Nelissen P, Holmes MA, Demetriou JL (2015) Outcome of full-thickness skin grafts used to close skin defects involving the distal aspects of the limbs in cats and dogs: 52 cases (2005–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 247: 1042-1047.

Scharf VF (2017) Free grafts and microvascular anastomoses. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 47:1249-1262.

Siegfried E, Bree A, Fete M, Sybert VP (2005) Skin erosions and wound healing in ankyloblepharon–ectodermal defect–cleft lip and/or palate. **Archives of Dermatology** 141:1591-1594.

Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA (2017) Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research** 7: 212-223.

Stanley BJ, Cornell K (2018) Wound healing. In: Johnston SA, Tobias KM (Eds.) **Veterinary Surgery Small Animal**. St. Louis, p. 487-530.

Stanley BJ, Pitt KA, Weder CD, Fritz MC, Hauptman JG, Steficek BA (2013) Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery** 42:511-522.

Stephenson AJ, Griffiths RW, Hausse-Brown TL (2000) Patterns of contraction in human full thickness skin grafts. **British Journal of Plastic Surgery** 53:397-402.

Swaim SF (1990) Skin grafts. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 20:147-175.

Swaim SF (2007) Enxertos cutâneos In: Slatter M (Ed.) **Manual De Cirurgia Em Pequenos Animais**. São Paulo, cap. 24.

Tanner JC, Vandeput J, Olley JF (1964) The mesh skin graft. **Plastic and Reconstructive Surgery** 34:287-292.

Teixeira Neto N, Chi A, Paggiaro AO, Ferreira MC (2010) Tratamento cirúrgico das feridas complexas. *Revista de Medicina de São Paulo* 89:147-152.

Tuner J, Hode L (2010) Therapeutic lasers In: Tuner J, Hode L (Eds.). **The New Laser Therapy Handbook**. New York, p. 43-48.

Williams JM, Fowler D (1999) Wound management and reconstruction. In: Williams JM, Fowler D (Eds.) **Manual Of Canine And Feline Wound Management And Reconstruction**. Cheltenham, p. 1-4.

Woodruff L, Bounkeo J, Brannon W, Dawes K, Barham C, Waddell D, Enwemeka C (2004) The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery** 22: 241-247.

CAPÍTULO 2 – Comparação entre as ondas contínua e pulsada do laser de baixa intensidade (LBI) na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO - A enxertia cutânea é uma técnica cirúrgica simples e bastante útil para o reparo de feridas, principalmente, onde há dificuldade em realizar a síntese direta, ou outras técnicas reconstrutivas. Entretanto, para a sobrevivência do enxerto, é necessário que o leito da ferida esteja saudável e com a presença de tecido de granulação viável. O laser de baixa intensidade (LBI) já foi utilizada com sucesso em casos em que o enxerto foi aplicado em feridas logo após a sua criação. No entanto, a LBI ainda carece de padronizações mediante estudos conflitantes sobre seus resultados. Desta forma, este trabalho objetivou comparar a eficácia da LBI de onda contínua com onda pulsada na estimulação da cicatrização de enxertos cutâneos, aplicados em feridas recém-criadas em coelhos. Para tanto, foram utilizados 31 coelhos distribuídos em: grupo controle (GC, n=10), grupo laser onda contínua (GLC; n=10) e grupo laser onda pulsada (GLP; n=11). Os grupos GLC e GLP apresentaram evolução semelhante, com processo cicatricial satisfatório do enxerto, ao contrário do grupo GC. Tais resultados se mantiveram na avaliação microscópica, pois os grupos tratados com laser apresentaram menor inflamação, melhor integração à área receptora, maior reepitelização e colagenização. Não houve diferença na densidade vascular entre os grupos de tratamento na análise imuno-histoquímica. A ferida recém-criada não foi capaz de fornecer nutrição para o enxerto cutâneo nos coelhos, mas a LBI é uma terapia adjuvante eficiente em estimular a cicatrização entre a área receptora e o enxerto, promovendo integração total. Entretanto, embora estatisticamente não houve diferença na forma de emissão de luz, pulsada ou contínua, os pacientes que receberam LBI em onda contínua apresentam evolução microscópica superior.

Palavras-chave: cicatrização, enxertia, laserterapia

Introdução

A técnica de enxertia cutânea se baseia no preenchimento do defeito por meio de um segmento da epiderme e da derme que foi completamente removido da área doadora e transferido para o leito receptor (Swaim,1990; Andreassi et al., 2005; Scharf, 2017). Sua aplicabilidade é incontestável em regiões em que não há tecido adjacente suficiente para cobertura primária. Portanto, na Medicina Veterinária é uma técnica de destaque em razão da alta casuística de perda cutânea em decorrência de traumatismos ou remoção de tumores, particularmente, em lesões de extremidades,

nas quais a escassez e a imobilidade cutânea impedem a elaboração de retalhos locais (Tong; Simpson, 2012; Scharf, 2017).

Os enxertos cutâneos possuem limitações na utilização em animais domésticos, principalmente, devido à necessidade da presença de tecido de granulação saudável, ausência de tecido necrótico, infecção e corpos estranhos, impedindo a evolução para o resultado esperado (Fowler, 2006). Usualmente, é necessário o preparo da ferida para induzir a cicatrização por segunda intenção, previamente à realização da técnica, o que requer grande disponibilidade e cuidado por parte do tutor, além de onerar o tratamento. Tais condições contribuem para a restrição de animais elegíveis quanto ao emprego deste procedimento (Miraliakbari; Mackay 2006, Tong; Simpson, 2012). Desta forma, algumas ferramentas têm sido estudadas como potenciais estimulantes da cicatrização de enxertos aplicados em feridas recém-criadas. Opções como o plasma rico em plaquetas, terapia vácuo assistida e o laser de baixa intensidade (LBI) se mostram eficazes e permitiram a aplicação do enxerto de forma precoce (Stanley et al., 2013; Reis Filho et al., 2017; Pazzini et al., 2018).

A LBI possui diversos potenciais benefícios clínicos, incluindo a promoção do estímulo na cicatrização de feridas abertas, consolidação de fraturas, auxílio na reparação de lesões tendíneas e ligamentares, além do alívio da dor (Godine, 2014). Entretanto, apesar de resultados promissores, alguns estudos, como Gammel et. al (2017), não encontraram evidências de benefício na utilização da LBI. Muitas vezes, a justificativa para os resultados conflitantes se dá pela ausência de padronizações de variáveis presentes na técnica. Considerando que há algum grau de consenso quanto aos melhores comprimentos de onda da luz e doses aceitáveis a serem utilizadas, não há acordo sobre se a emissão de luz em onda contínua (CW) ou onda pulsada (PW) é mais adequada em aplicações pontuais (Hashmi et al., 2010).

Mediamente a problemática exposta, este estudo teve como objetivo comparar a eficácia entre LBI de onda contínua e a LBI de onda pulsada na estimulação da cicatrização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) evitando, desta forma, a necessidade de aplicação do enxerto na presença de tecido de granulação.

Material e Métodos

A pesquisa foi executada 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. A metodologia deste experimento respeitou as diretrizes dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo número 03286/18, da mesma instituição.

Seleção dos animais para o procedimento cirúrgico e protocolo anestésico

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos. Os animais eram procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu, e foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais em condições de alimento e água *ad libitum*.

A pesquisa utilizou um total de 36 coelhos, distribuídos em três grupos distintos: 12 coelhos no grupo controle (GC), 12 no grupo laser de onda contínua (GLC) e 12 no grupo laser onda pulsátil (GLP).

O protocolo anestésico utilizado foi composto por medicação pré-anestésica (MPA) composta por clorpromazina², na dose de 0,5 mg/kg e morfina³, 0,5 mg/kg, ambas na mesma seringa, aplicadas por via intramuscular (IM). Após 20 minutos, foi realizada a indução anestésica com isoflurano⁴, empregando máscara facial, seguida de manutenção anestésica com 3% de isoflurano diluído em 100% de oxigênio.

Procedimento cirúrgico

Após a indução anestésica, os animais foram preparados com ampla tricotomia na área doadora (AD), correspondente à região de terço distal da parede lateral do tórax direito, na altura da articulação costocostal, e também da área receptora (AR), localizada na face cranial do terço médio de rádio e ulna do membro torácico direito

² Amplictil® 25mg/5mL, Aventis

³ Dimorf® 10mg/mL, Cristália

⁴ Isoforine® 100mL, Cristália

(Figura 2.1). Em seguida, as antissepsias, prévia e definitiva, foram realizadas, ambas com utilização de clorexidina degermante 2%⁵ e álcool 70%⁶.

Na AR foi criada uma ferida cutânea de espessura total, abrangendo pele e subcutâneo, com a utilização de lâmina de bisturi número 15, respeitando como base o formato de um molde plástico que media 2cm x 2cm (Figura 2.1). O subcutâneo foi divulsionado de maneira romba até que todo o fragmento fosse removido e, posteriormente, descartado. O mesmo procedimento foi repetido na AD, porém o fragmento de pele foi utilizado como enxerto (Figura 2.1). Toda a porção subcutânea do enxerto foi removida por secção com tesoura, até que permanecesse somente a derme e epiderme (Figura 2.1). Em seguida, foram realizadas pequenas fenestras 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 (Figura 2.1).

O enxerto foi, então, posicionado na ferida da AR e suturado junto às bordas, utilizando pontos simples separados e fio de sutura de náilon 3-0. A AD foi suturada com pontos em padrão simples contínuo utilizando náilon 3-0 para aproximação das bordas incisadas (Figura 2.1).

Tanto na ferida cirúrgica da AR como da AD foram realizados curativos com bandagem não aderente, composta por gaze estéril umedecida com solução salina 0,9% e atadura de algodão, fixados com esparadrapo.

Grupo controle (GC): Os animais, aleatoriamente 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 laser onda contínua (GLC): Os animais deste grupo foram submetidos à LBI, imediatamente após o procedimento cirúrgico. A ferida foi limpa com solução salina 0,9% e gaze, e em seguida, foi removido todo o excesso de umidade também com gaze. Foram escolhidos 9 pontos distintos e pré-determinados de aplicação do

⁵ Riohex® 2%, Rioquímica

⁶ Álcool Líquido 70%, Tupi

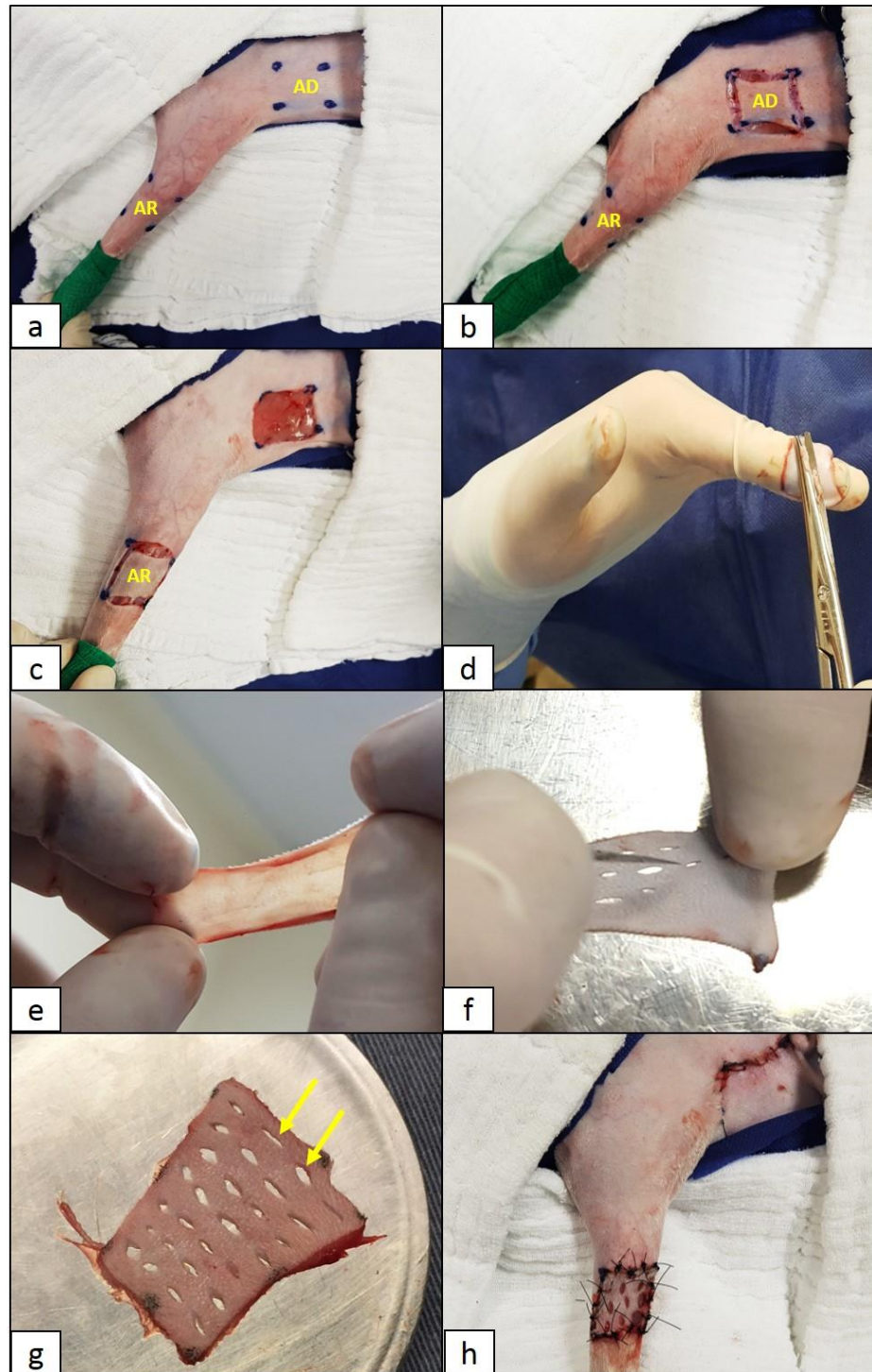


Figura 2.1. Fotografias do procedimento cirúrgico de enxertia cutânea em coelhos a) Demarcação da área doadora (AD) e área receptora (AR). b) Incisão da AD utilizada posteriormente como enxerto. c) Incisão de pele para criação do defeito cutâneo (AR). d) Remoção completa do tecido subcutâneo do enxerto e) Demonstração do enxerto preparado para sua implantação. f e g) Realização de fenestras no enxerto (setas amarelas). h) Fixação do enxerto na AR com pontos simples interrompidos e sutura da AD com pontos simples contínuos. Jaboticabal, 2019.

laser (Figura 2.2). Foi utilizado o aparelho de laser Laserpulse Ibramed® modelo L42, com transdutor de comprimento de onda 660 nanômetros (nm) e 30 mW (miliwatt) de potência. A dose do laser utilizada foi de 4 J/cm² em onda contínua, durante 8 segundos em cada ponto pré-determinado. O protocolo de laser foi novamente aplicado nos animais no 3^o e 7^o dia de pós-operatório, durante a troca do curativo, após a limpeza da ferida.

Grupo laser onda pulsátil (GLP): Nos animais deste grupo respeitou-se a mesma metodologia aplicada ao GFC, excetuando pela dose do laser que foi de 4 J/cm² à 150 Hz em onda pulsada, durante 16 segundos em cada ponto pré-determinado (Figura 2.2).

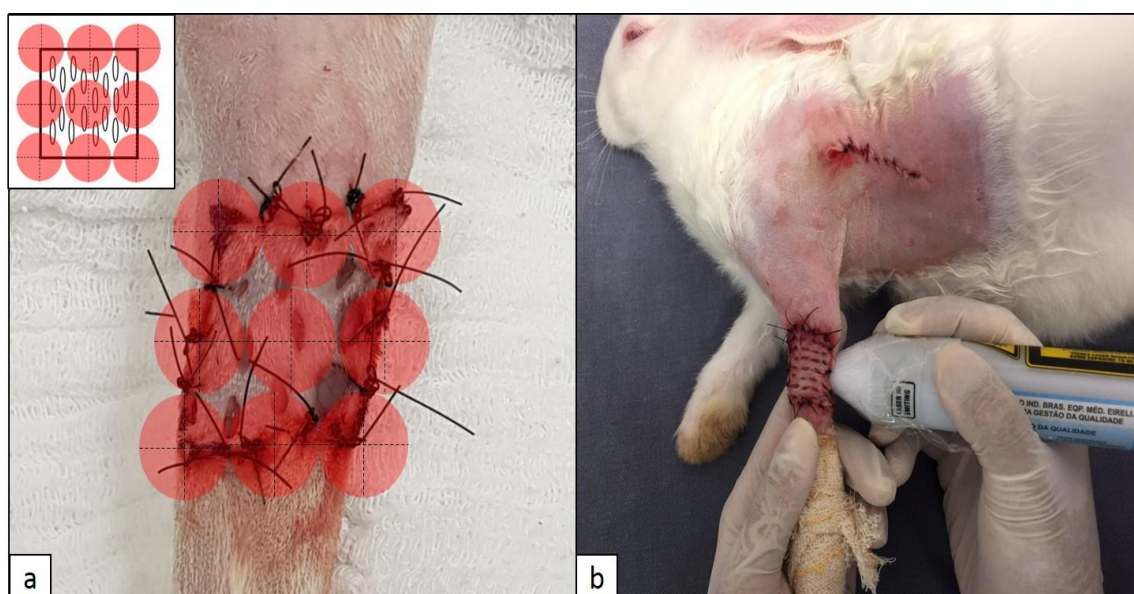


Figura 2.2. Figuras demonstrando a técnica de laser de baixa intensidade (LBI) aplicada no enxerto cutâneo dos coelhos do grupo laser, onda contínua (GLC) e do grupo laser, onda pulsátil (GLP). a) Representação esquemática das áreas pré-determinadas para a aplicação da LBI (círculos vermelhos). b) Fotografia representando a aplicação da LBI. Jaboticabal, 2019.

Protocolo terapêutico pós-operatório, troca de curativos e critérios de exclusão

No período pós-operatório, os animais receberam enrofloxacina⁷ (5 mg/kg, a cada 12 horas, por via subcutânea) e cloridrato de tramadol⁸ (3 mg/kg, a cada 12

⁷ Chemitril Injetável 2,5%®, Chemitec

⁸ Tramadon® ampola 50 mg/mL, Cristália

horas, por via subcutânea), ambos, durante 5 dias seguidos, além de meloxicam⁹ (0,1 mg/kg, por via subcutânea) a cada 24 horas, nos três primeiros dias.

As trocas de curativos foram realizadas no 3^o e 7^o dia da cirurgia, em todos os grupos experimentais. Após a retirada das bandagens, a ferida cirúrgica foi lavada gentilmente com solução fisiológica estéril e as sujidades removidas, com auxílio de gaze igualmente estéril. O curativo foi reaplicado, seguindo os mesmos princípios do período pós-operatório imediato. Nos animais dos grupos GLC e GLP, a aplicação da LBI ocorreu após a limpeza das feridas, antes da recolocação das bandagens.

Animais foram excluídos do estudo quando, durante o período de pós-operatório, houveram intercorrências relacionadas ao curativo, como queda da bandagem ou retirada pelo próprio animal.

Procedimento de eutanásia

O procedimento de eutanásia foi realizado no 15^o dia do período pós-operatório, em todos os animais do experimento. Estes foram anestesiados com propofol¹⁰ (dose de 10mg/kg) e, quando se certificava da ausência de reflexos corneal e pupilar, foi realizada a aplicação de 20 mL de cloreto de potássio¹¹ por via endovenosa para a indução de assistolia.

Processamento das amostras.

Imediatamente após a eutanásia, a porção cutânea enxertada foi totalmente removida da AR em bloco, incluindo uma pequena porção de pele do leito receptor, afim de permitir análise da área de transição pele x enxerto (Apêndice A). As amostras foram acondicionadas em formol¹² a 10%, na proporção 1:9, por 48 horas e transferidas para solução de álcool⁵ a 70% até o momento do processamento.

As amostras foram clivadas e inclusas em parafina. Os cortes realizados foram transversais de 4 μ (micrometros) em micrótomo. Após o preparo, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

Avaliação microscópica.

Os parâmetros de inflamação, reepitelização, integração da pele com o enxerto e necrose foram analisados nas lâminas coradas com HE. As leituras foram realizadas

⁹ Maxican® 2%, Ourofino

¹⁰ Propovan® 10mg/mL, Cristália

¹¹ Cloreto de potássio 19,1%, Euquiplax®

¹² Formol 10%, Anidrol®

por avaliador único, sem identificação de grupo, em microscópio¹³ utilizando objetivas de 4x, 20x e 40x, sequencialmente, seguindo os parâmetros descritos por Reis Filho et al. (2017) (Apêndice B).

A formação de colágeno e tecido de granulação nas amostras foram avaliadas por coloração especial de Tricrômico de Masson e a quantificação da área de deposição de colágeno dentro do local do enxertado foi dado em porcentagem, assim como descrito por Reis Filho et al. (2017) (Apêndice B).

Imuno-histoquímica

Para o estudo imunohistoquímico, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, com adesivos comerciais¹⁴. Os cortes obtidos foram encaminhados para processamento com anticorpo CD31¹⁵ na diluição 1:50 e recuperação enzimática¹⁶ por 45 minutos, utilizando sistema de detecção¹⁷ para leitura.

O índice angiogênico obtido, após marcação com CD31, foi determinado pela técnica de contagem microvascular (MCV), conforme preconizado por Maeda et al. (1995). A contagem dos vasos ocorreu em cinco campos, selecionados previamente, com elevada densidade vascular, no aumento de 400x, utilizando microscópio óptico de luz¹⁸. Após a somatória do número de vasos, a contagem final foi expressa a média de vasos em cada caso estudado.

Análise estatística.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de correspondência 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 as referências para avaliar os efeitos dos diferentes grupos de tratamentos. Além disso, os resultados da avaliação microscópica também foram expostos em análise descritiva dos dados.

¹³ Nikon® E200

¹⁴ 3-aminopropiltriétoxi-silano - Sigma Chemical® - C.O – United States

¹⁵ Monoclonal, Dako®, JC70A

¹⁶ Pepsina Porcine Gastric Mucosa – Sigma life science® – United Kingdom

¹⁷ Novolink Polymer Detection Systems® - Leica Biosystems New Castle Ltda- United Kingdom

¹⁸ Nikon® E200

A análise das médias da contagem microvascular foi submetida ao teste de Tukey, processadas no software Statistica, versão 7 (StatSoft, 2004), para a comparação das médias entre os grupos de tratamento.

Resultados e Discussão

Dos 36 animais utilizados neste experimento, cinco foram suprimidos, cumprindo os critérios estabelecidos para exclusão. Portanto, foram incluídos no estudo o total de 31 coelhos, distribuídos da seguinte forma: 10 coelhos no grupo controle (GC), 10 no grupo laser de onda contínua (GLC) e 11 no grupo laser de onda pulsada (GLP). De modo geral, foi possível observar evolução clínica semelhante dos animais do grupo GLC e GLP, mas diferente do GC. Em ambos os grupos de tratamento com o LBI, os enxertos apresentaram coloração rósea no momento da primeira troca de curativo (3º dia do período de pós-operatório), que se manteve ao 7º dia (Figura 2.3). Já no GC, a palidez foi frequentemente observada no primeiro momento e, ao 7º dia, era possível notar áreas enegrecidas na superfície do enxerto (Figura 2.3).

Nos primeiros dias após a enxertia cutânea, o diagnóstico de necrose estimado somente por meio de sua coloração pálida pode ser impreciso. Deve-se lembrar que, esse período, corresponde ao momento em que a viabilidade do enxerto é mantida pela embebição plasmática. Somente por volta do sexto dia de cicatrização, o fluxo sanguíneo será completamente reestabelecido (Scharf, 2017). Portanto, a coloração pálida, nesse período, não necessariamente é condizente com degeneração. Todavia, a observação da coloração rósea, três dias após a realização dos procedimentos nos animais tratados com LBI, pode indicar processo cicatricial avançado, provavelmente por estímulo angiogênico precoce provocado pelo laser. A confirmação dessa suposição, somente seria possível caso amostras para análise microscópicas tivessem sido coletadas ao 3º dia do período pós-operatório, o que não ocorreu nesse estudo, afim de se evitar repetitivos procedimentos cirúrgicos nos animais experimentais. No 15º dia do período pós-operatório, a maioria dos animais do GLC e

GLP apresentavam enxertos com coloração semelhante ao tecido normal, além de

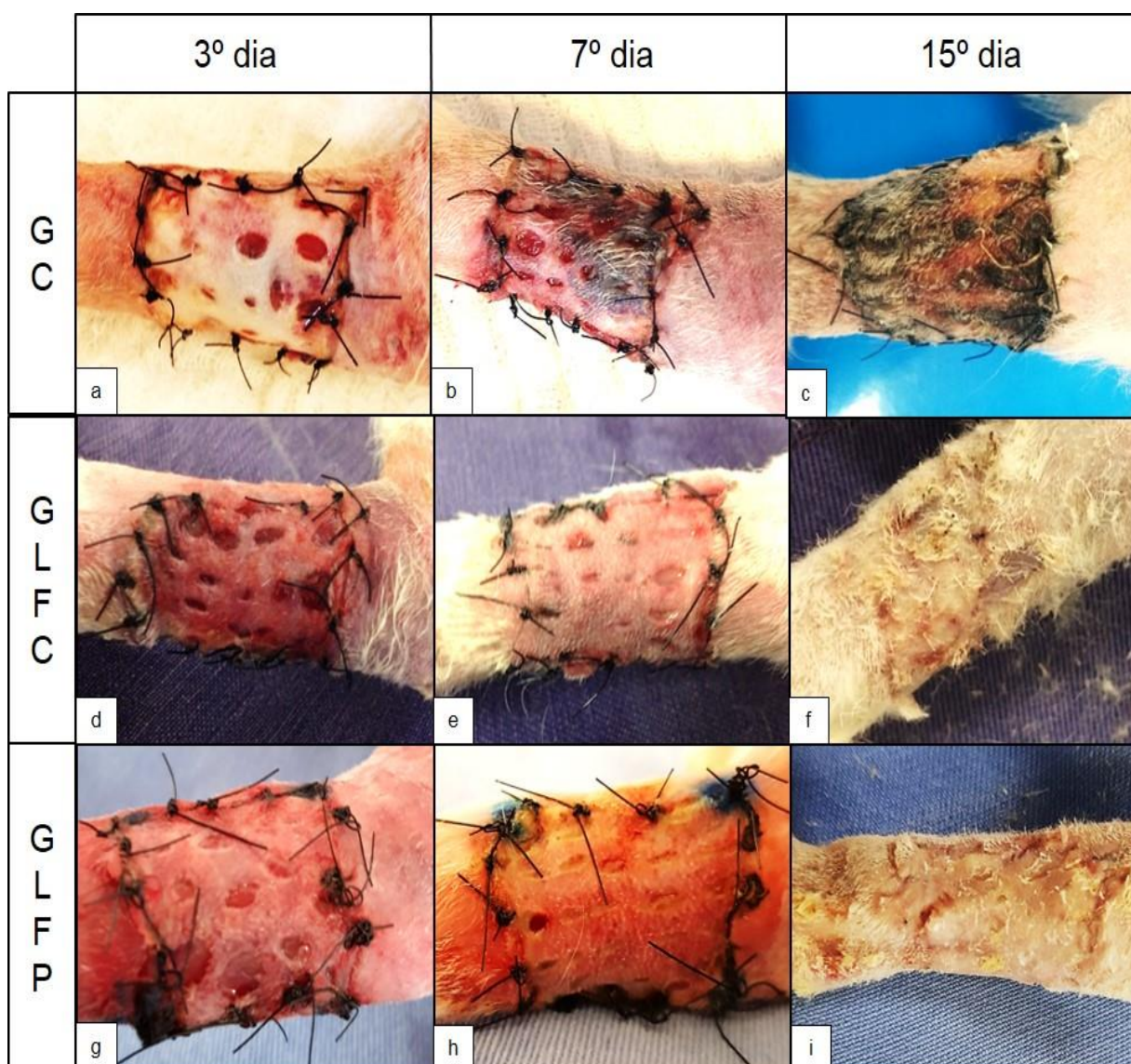


Figura 2.3. Fotografias ilustrativas de enxertos cutâneos em coelhos dos diferentes grupos de tratamento, durante os três momentos de troca do curativo. a) Aparência macroscópica do enxerto no 3º dia de pós-operatório (PO) de coelho do grupo controle (GC). b) 7º dia de PO do grupo GC, notar início de degeneração. c) 15º dia de PO do grupo GC, observa-se área extensa de necrose. d) 3º dia de PO do grupo laser onda contínua (GLC), notar coloração rósea já em momentos iniciais. e) 7º dia de PO do grupo GLC. f) 15º dia de PO do grupo GLC, notar integração satisfatória do enxerto. g) 3º dia de PO do grupo laser onda pulsada (GLP). h) 7º dia de PO do grupo GLP. i) 15º dia de PO do grupo GLP, notar integração total do enxerto. Jaboticabal, 2019.

completa incorporação com a AR (Figura 2.3), condizente com os bons resultados já demonstrados da LBI em enxertos cutâneos (Reis Filho et al., 2017). Nos animais do GC, foi frequente a observação da degeneração dos enxertos no 15º dia, momento no

qual apresentavam coloração enegrecida e algum grau de exsudação, sinais indicativos de falha da técnica (Figura 2.3). Embora visivelmente distintas, as variáveis macroscópicas, correspondentes a evolução clínica dos enxertos cutâneos, não foram quantificadas e nem analisadas estatisticamente no presente estudo. A subjetividade e alto grau de interferências observacionais encontradas nesse tipo de análise, tornam a avaliação microscópica mais relevante, como já demonstrado em outras pesquisas (Stanley et al., 2013; Pazzini et al., 2016; Reis Filho et al., 2017). Entretanto, considera-se relevante trazê-los aqui em forma de observação, pois são parâmetros encontrados pelos clínicos durante as trocas de curativos na enxertia cutânea.

Por meio da análise microscópica, alguns achados se mostraram relevantes. A maioria dos animais apresentou sinais de inflamação discreta, porém, os animais do grupo GLC foram os que apresentaram menor quantidade de sinais de inflamação (Gráfico 2.1, Figura 2.4). Baseado no conhecimento do processo cicatricial de enxertos, não é esperada a presença de inflamação após 15 dias decorridos do procedimento cirúrgico, mas sim em momentos iniciais (Bohling; Swaim, 2018). Não é possível atribuir diretamente à LBI um potencial anti-inflamatório apenas por essa observação, porém pode-se inferir que a área receptora sem tecido de granulação não forneceu leito que proporcionasse a adequada cicatrização do enxerto cutâneo nos animais do GC.

Ao observar a relação enxerto x pele, o GC representou a maior porcentagem dos casos onde houve degeneração, mesmo que a maioria dos animais tenha apresentado boa integração (Gráfico 2.1, Figura 2.4). A reepitelização foi classificada como acentuada em todos os casos dos grupos GLC e GLP, e em 60% dos animais do GC (Gráfico 2.1, Figura 2.4). Ademais, os animais do grupo GC representaram a maior porcentagem dentre os classificados como necrose acentuada (Gráfico 2.1, Figura 2.4). Por fim, a colagenização e a formação de tecido de granulação variou de moderada a acentuada na maioria dos casos, destacando-se os animais do grupo GLP que, em 63,6% dos casos, apresentou colagenização acentuada (Gráfico 2.1, Figura 2.5). Esses dados ressaltam diferenças na evolução cicatricial entre os grupos, principalmente entre os animais do GC com GLC e GLP. Os melhores resultados podem ser atribuídos ao uso da LBI, porém há de se notar que, embora haja uma contribuição para o atraso da cicatrização no GC, alguns animais apresentaram boa

integração, reepitelização e colagenização. Tal fato pode ser explicado pois, muitas vezes, apesar de sua degeneração, os enxertos cutâneos podem servir como curativos biológicos temporários, favorecendo a reepitelização da ferida abaixo do fragmento enxertado (Fowler, 2006).

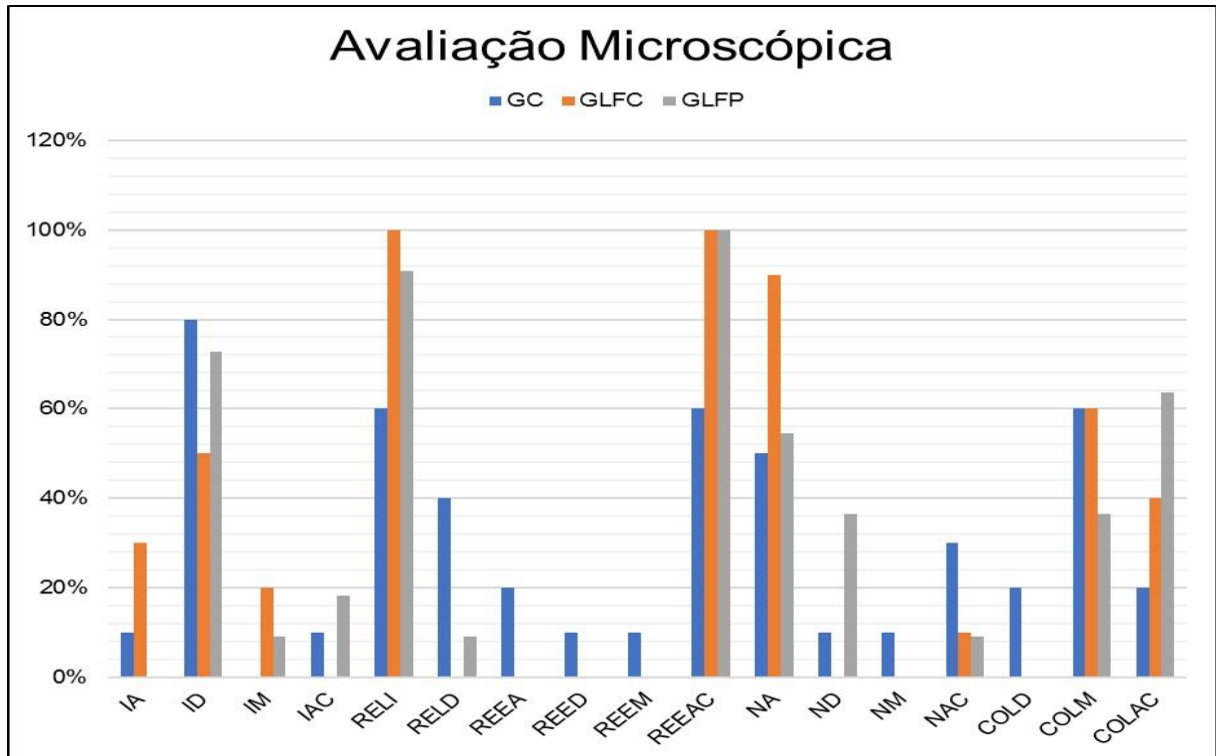


Gráfico 2.1. Média percentual dos parâmetros da avaliação microscópica em cada grupo de tratamento dos coelhos submetidos à enxertia cutânea. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); formação de colágeno moderada (COLM); formação de colágeno acentuada (COLAC); grupo controle (GC); grupo laser onda contínua (GLC); grupo laser onda pulsada (GLP). Jaboticabal, 2019.

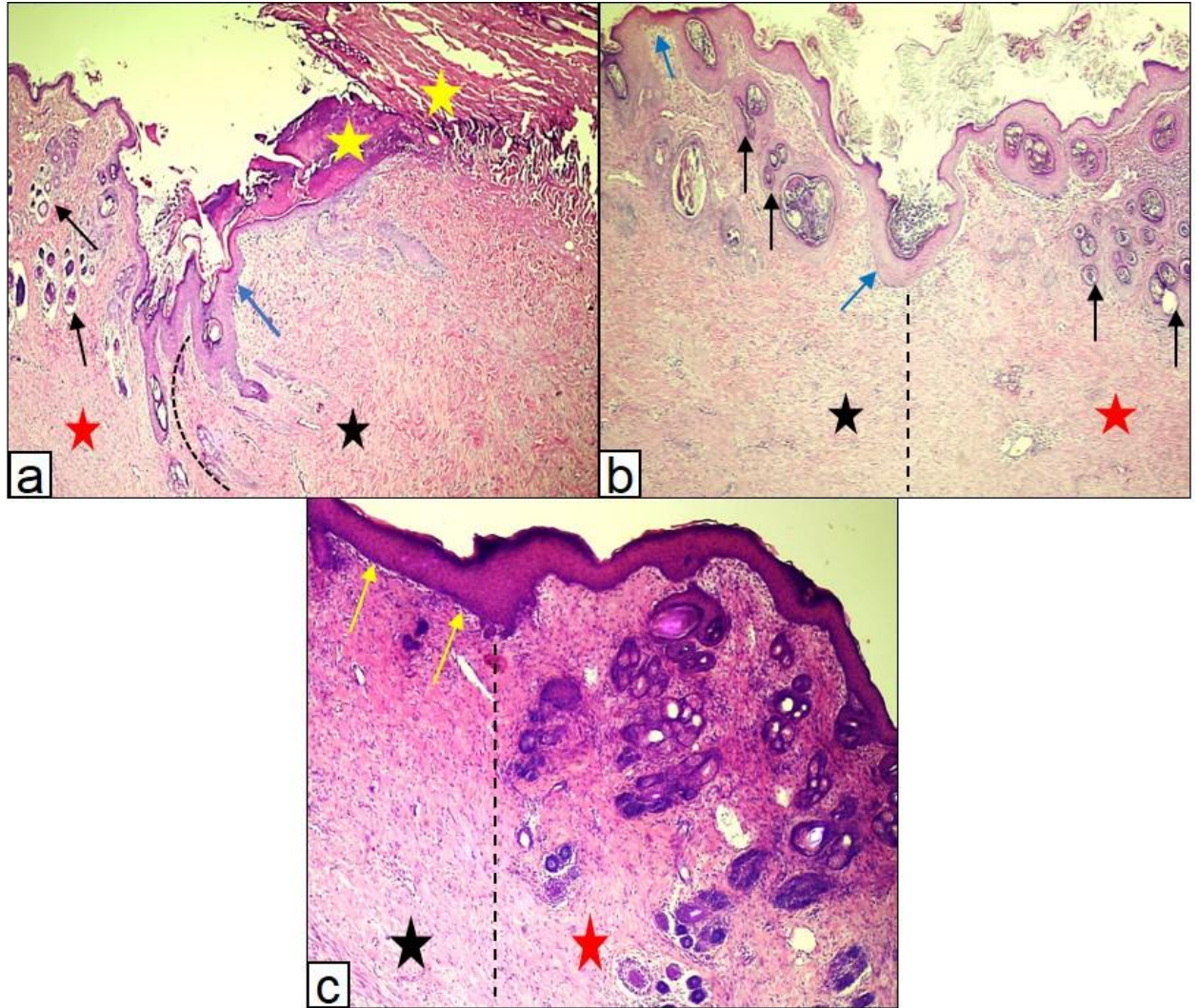


Figura 2.4. Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. a) Área de transição (pontilhado) entre a epiderme original (estrela vermelha), com os anexos cutâneos (seta preta) e o segmento reepitelizado (seta azul) associado à proliferação de colágeno (estrela preta). Na superfície epidermal verifica-se o enxerto desvitalizado e não integrado à região receptora (estrela amarela / grupo controle). b) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e área de reepitelização (seta azul), associada à proliferação de colágeno (estrela preta) com integração completa do enxerto cutâneo e presença de anexos cutâneos tanto na área enxertada como na pele original (seta preta/ grupo laser onda contínua). c) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) contendo anexos cutâneos e área de intensa reepitelização (seta amarela), associada à proliferação de colágeno (estrela preta) com integração completa do enxerto cutâneo (seta preta/ grupo laser onda pulsada). Objetiva de 4x, coloração Hematoxilina e Eosina. Jaboticabal, 2019.

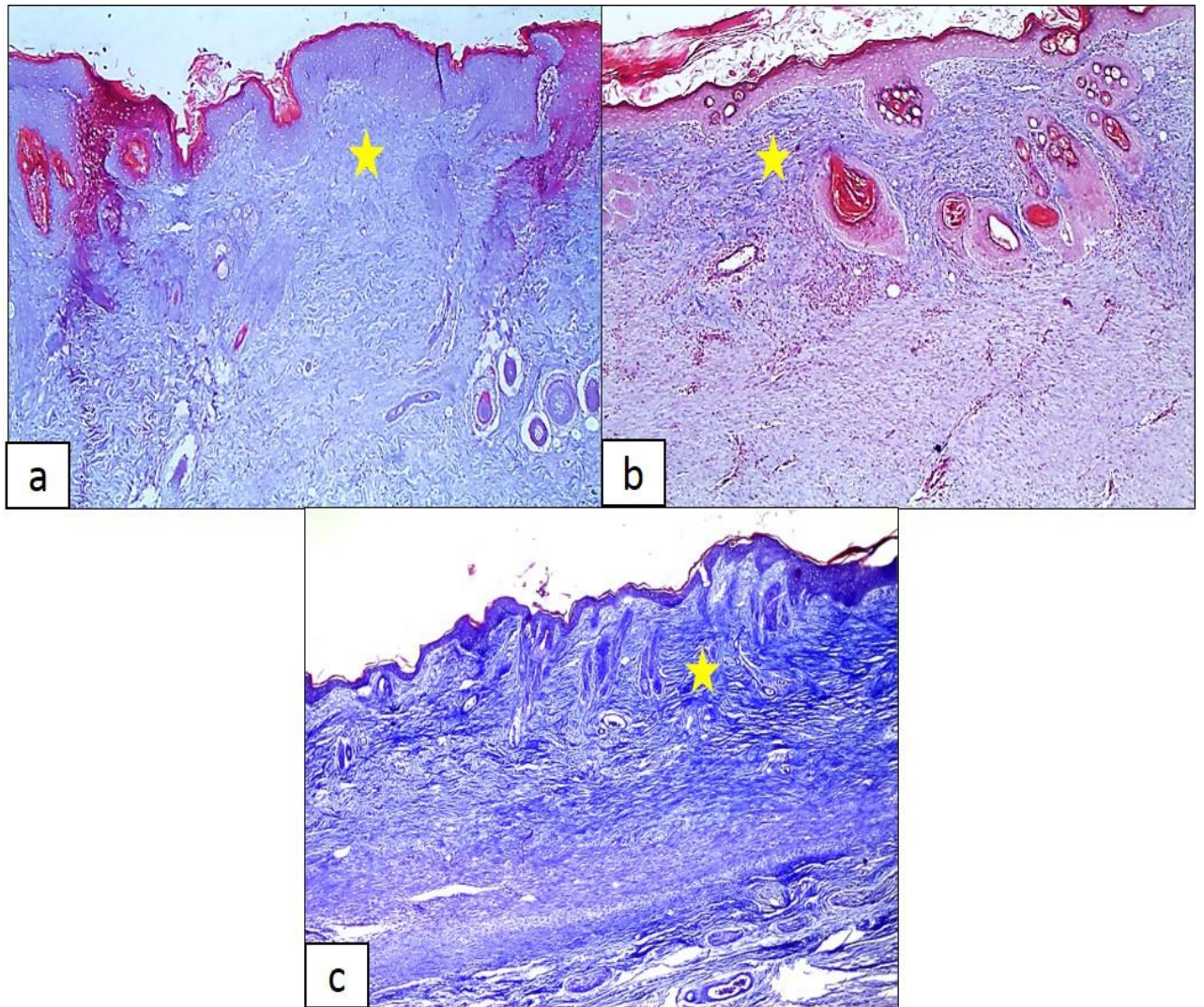


Figura 2.5. Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. As imagens demonstram áreas de intensa formação de colágeno jovem abaixo da área de reepitelização (estrela amarela), que ocorrem de forma semelhante nos diferentes grupos de tratamento. a) Grupo controle. b) Grupo laser onda contínua. c) Grupo laser onda pulsada. Objetiva de 4x, coloração Tricrômico de Masson. Jaboticabal, 2019.

Após a utilização da análise de correspondência múltipla com os resultados obtidos nos diferentes tratamentos, foi possível a identificação de dois grupos de categorias específicas. O primeiro grupo diz respeito à presença de REEA, REED, RELD, NAC e IAC nos animais do grupo GC (Figura 2.6), estatisticamente significativa para $p < 0,05$ (Quadro 2.1). É bastante aceito que, a área receptora deve estar livre de tecido necrótico, material estranho e infecção, para manter a viabilidade do enxerto (Scharf, 2017; Bohling; Swaim, 2018). No entanto, a presença ou ausência do tecido

de granulação é fonte de controvérsias. Erwin et. al (2016), estudaram o período ideal para aplicação de enxertos em gatos, e encontram resultados superiores quando as feridas já possuíam tecido de granulação. Já Riggs et. al (2015), atribuíram a presença do tecido de granulação à baixa taxa de sucesso encontrada em estudo retrospectivo de enxertia em cães. Os parâmetros encontrados em nosso estudo, atribuídos ao GC, são ligados à falha do enxerto e, desta forma, pode-se afirmar que a ferida recém-criada, sem granulação, não proporcionou ambiente ideal para sua sobrevivência. A divergência de resultados na literatura, provavelmente é proveniente de diferenças metodológicas marcantes entre os estudos, o que eleva a importância de nossos resultados.

O segundo grupo de categorias, identificou uma correspondência específica ao grupo GLP sobre a presença de ND, significantes estatisticamente para $p < 0,10$ (Quadro 2.1). Podemos interpretar tal correspondência como a eficácia da LBI em onda pulsada em evitar a degeneração total do enxerto, ao estimular melhor condição da área receptora para nutrir os enxertos.

Gammel e colaboradores (2018), não encontraram diferenças relevantes em animais onde a LBI aplicada em feridas incisionais em cães, embora tenha sido estatisticamente significativa, a maior quantidade de necrose nos animais que não receberam tratamento com laser, concordando com nosso estudo. Assim como Gammel e colaboradores (2018), Posten et al. (2005) ressaltam a falta de confirmações e as discordâncias sobre a ação da LBI em processos cicatriciais de feridas. Por outro lado, há na literatura alguns estudos comprovando a sua eficácia em lesões isquêmicas (Prado et al., 2006; Bossini et al., 2009; Prado et al., 2012). Portanto, provavelmente exista alguma ação específica da LBI em tecidos sob degeneração, como ocorre naturalmente nos enxertos, que proporcione resultados mais positivos comparado a sua aplicação em feridas incisionais ou após desbridamento.

Na LBI em onda pulsada, a forma de emissão da luz proporciona melhor capacidade de penetração nos tecidos, sem provocar danos térmicos causados pela elevação da temperatura (Hashmi et al., 2010). Essas duas características seriam muito interessantes na sua aplicação em enxertos, afinal, trata-se de porções de pele delicadas, que sofreriam danos por alteração de temperatura, e pela necessidade da

ação do laser na área receptora, abaixo do enxerto. Apesar de esperar melhor evolução nos animais do GLP, não foram observadas diferenças relevantes comparado com o GLC. Provavelmente, a dose da LBI utilizada neste estudo pode ter sido alta o suficiente para haver algum prejuízo quando a luz foi emitida de forma contínua. Segundo, Ilic et. al (2006), lesões térmicas são somente observadas em doses elevadas de LBI.

Outros dois grupos de categorias foram identificadas, porém, independentes do grupo de tratamento. A característica de NAC apresenta alta correspondência com IAC, REED, REEA, REED ($p < 0,05$; Quadro 2.1), e REED com REEA ($p < 0,05$; Quadro 2.1). Embora estes achados não tenham relação direta com nenhum grupo, demonstram que, os parâmetros microscópicos indicativos de falha do enxerto apresentaram alto grau de correlação, reforçando a confiabilidade da metodologia utilizada para análise neste estudo.

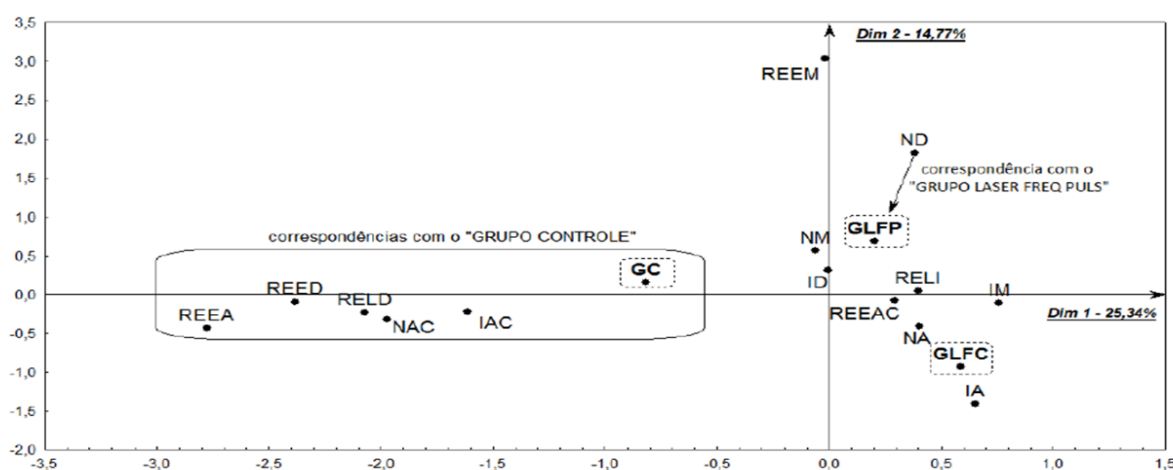


Figura 2.6. Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla dos achados microscópicos entre todos os grupos de tratamento de enxerto cutâneo em coelhos. Os parâmetros circulados apresentaram associação estatisticamente significativa com o grupo controle, pois estão distantes do eixo zero do mapa. Além disso, pode-se observar que o grupo laser onda pulsada apresentou associação com o parâmetro necrose discreta. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC); grupo controle (GC); grupo laser onda contínua (GLC) e grupo laser onda pulsada (GLP). Jaboticabal, 2019.

	GC	GLFC	GLFP	IA	ID	IM	IAC	RELI	RELD	REEA	REED	REEM	REEAC	NA	ND	NM
GC																
GLFC	-1,796															
GLFP	-1,884	-1,884														
IA	-0,256	1,505	-1,191													
ID	0,471	-0,682	0,201	-1,646												
IM	-0,984	1,049	-0,063	-0,622	-1,426											
IAC	0,033	-0,984	0,907	-0,622	-1,426	-0,539										
RELI	-0,824	0,557	0,255	0,352	0,092	0,305	-0,956									
RELD	1,880	-1,270	-0,581	-0,803	-0,210	-0,696	2,180	-2,048								
REEA	1,687	-0,803	-0,842	-0,508	-0,305	-0,440	1,833	-1,295	2,953							
REED	1,193	-0,568	-0,596	-0,359	0,392	-0,311	-0,311	-0,916	2,088	-0,254						
REEM	1,193	-0,568	-0,596	-0,359	0,392	-0,311	-0,311	0,176	-0,402	-0,254	-0,180					
REEAC	-0,918	0,437	0,459	0,277	-0,068	0,239	-0,379	0,495	-1,128	-1,320	-0,933	-0,933				
NA	-0,572	1,003	-0,412	0,884	-0,149	0,046	-0,672	0,543	-1,239	-1,136	-0,803	-0,803	0,6183			
ND	-0,483	-1,270	1,671	-0,803	0,333	0,742	-0,696	0,394	-0,898	-0,568	-0,402	2,088	-0,170	-1,796		
NM	1,193	-0,568	-0,596	-0,359	0,392	-0,311	-0,311	0,176	-0,402	-0,254	-0,180	-0,18	0,138	-0,803	-0,402	
NAC	1,092	-0,483	-0,581	-0,803	-0,210	-0,696	2,180	-1,559	3,556	2,953	2,088	-0,402	-1,128	-1,796	-0,898	-0,402

Quadro 2.1. 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 para $p < 0,05$, e em azul para $p < 0,10$. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC); grupo controle (GC); grupo laser onda contínua (GLC) e grupo laser onda pulsada (GLP). Jaboticabal, 2019.

Ao analisar a formação de novos vasos após o 15º dia de pós-operatório pelo método de imuno-histoquímica, foi possível visibilizar maior densidade vascular nas amostras dos animais do grupo GLP, quando comparado aos demais grupos (Figura 2.7). Desta forma, os animais do grupo GLP (\bar{x} 30,32) apresentaram média ligeiramente maior, comparados ao GC (\bar{x} 24,06) e GLC (\bar{x} 25,76), porém, sem significância estatística ($p > 0,05$) (Gráfico 2.2). Podemos inferir que, neste estudo, a LBI contribuiu para a viabilidade dos enxertos cutâneos, mas provavelmente por outros benefícios como o incremento do metabolismo celular, e não por estímulo angiogênico. Fato talvez justificado pela dose utilizada, já que, Cury et. al (2013) comprovaram o potencial de angiogênese da LBI, porém ressaltando seu efeito dose dependente.

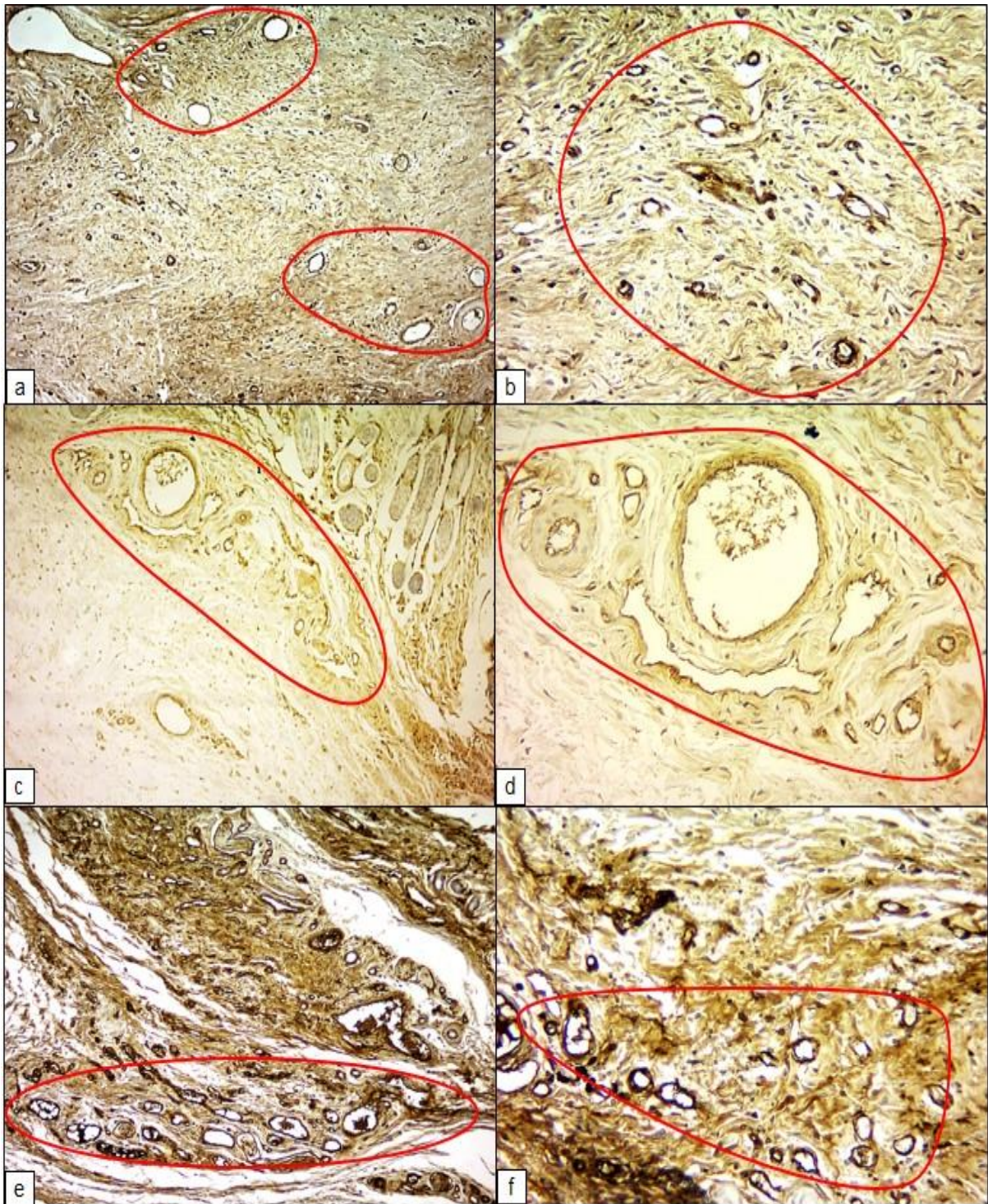


Figura 2.7. Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. Nota-se a coloração marrom mais escura representando vasos sanguíneos. As áreas demarcadas em vermelho representam maior concentração de vasos a) Grupo controle objetiva de 10x. b) Grupo controle, objetiva de 20x. c) Grupo laser onda contínua, objetiva 10x. d) Grupo laser onda contínua, objetiva 20x. e) Grupo laser onda pulsada, objetiva 10x. f) Grupo laser onda pulsada, objetiva 20x. Coloração imuno-histoquímica, anticorpo CD31. Jaboticabal, 2019.

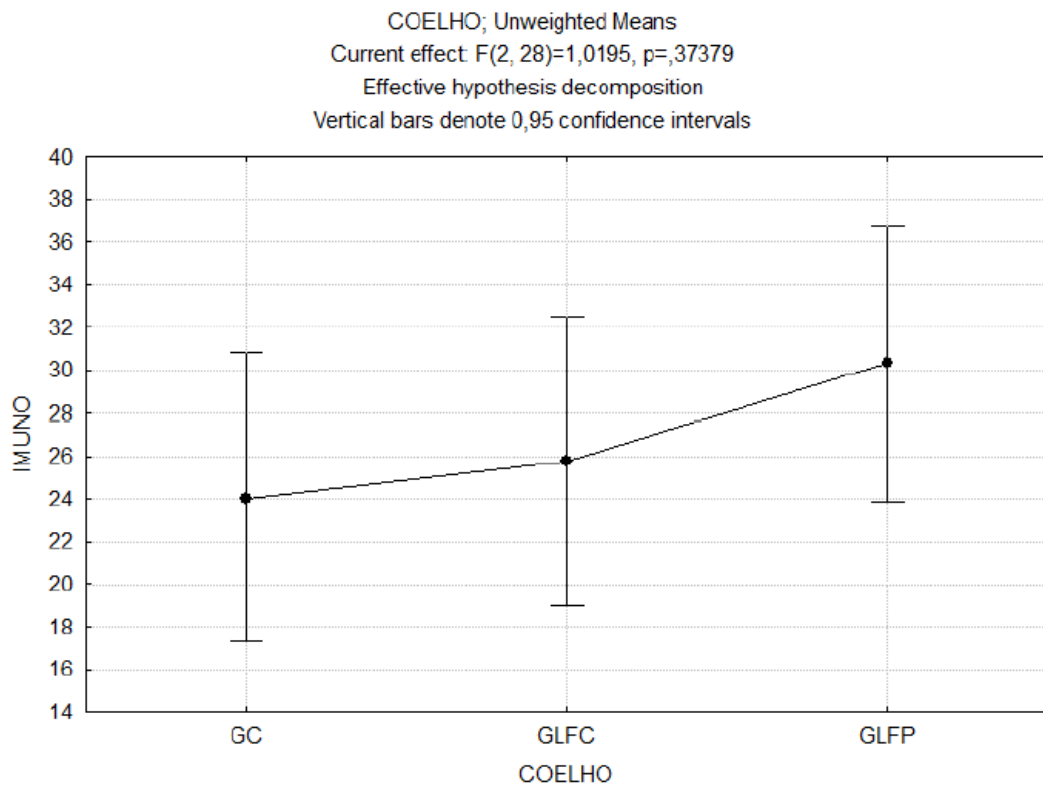


Gráfico 2.2. Gráfico das médias da contagem microvascular (MCV) por meio de técnica de imuno-histoquímica (CD31) em coelhos submetidos a técnica de enxertia cutânea em diferentes grupos de tratamentos. Legenda: IMUNO (índice de MCV); grupo controle (GC); grupo laser onda contínua (GLC) e grupo laser onda pulsada (GLP). Jaboticabal, 2019.

Conclusão

Conclui-se que, a utilização do enxerto cutâneo imediatamente após a criação do defeito em coelhos, não proporciona resultados satisfatórios, pois a área receptora não é capaz de nutrir o enxerto de forma eficaz, até que a vascularização seja reestabelecida. A LBI é uma terapia adjuvante eficaz para estimular a cicatrização, contribuindo para a integração do enxerto com a pele. Entretanto, na dose de 4 J/cm^2 , não há diferença entre a emissão da luz de forma pulsada ou contínua neste processo.

Referências¹⁹

Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'aniello C (2005). Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology** 23:332-33.

Bohling MW, Swaim SF (2018) Skin grafts. In: Johnston SA, Tobias KM (Eds.) **Veterinary Surgery Small Animal**. St. Louis, p. 3952-4002.

Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, et al. (2009). Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers In Medical Science** 24:209-213.

Cury V, Moretti AIS, et al. (2013). Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 125:164-170.

Erwin G, Handharyani E, Noviana D (2016). Subjective and objective observation of skin graft recovery on Indonesian local cat with different periods of transplantation time. **Veterinary World**, 9(5), 481-486.

Fowler D (2006) Distal limb and paw injuries. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 36:819–845.

Gammel JE, Biskup JJ, Drum MG, Newkirk K, Lux CN (2018). Effects of low-level laser therapy on the healing of surgically closed incisions and surgically created open wounds in dogs. **Veterinary Surgery** 47:499-506.

Godine RL (2014) Low level laser therapy (LLLT) in veterinary medicine. **Photomedicine Laser Surgery** 32:10-25.

¹⁹ Baseado em: NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE DISSERTAÇÃO E TESE DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP, CÂMPUS DE JABOTICABAL, versão 2018.

Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, Hamblin MR (2010) Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers In Surgery And Medicine** 42:450-466.

Ilic S, Leichter S, Streeter J, Oron A, DeTaboada L, Oron U (2006). Effects of power densities, continuous and pulse frequencies, and number of sessions of low-level laser therapy on intact rat brain. **Photomedicine and Laser Therapy** 24:458-466.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T., Kondo Y, Sowa M (1995) Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British Journal Of Cancer** 72:319-326.

Miraliakbari R, Mackay DR (2006) Skin Grafts. **Operative Techniques in General Surgery** 8:197-206.

Pazzini JM, Serafim EL, et al. (2018) Surgical sponge associated with platelets rich plasma in skin mesh grafts and layer in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 70:1339-1348.

Pazzini JM, Serafim, et al. (2016) Emprego de plasma rico em plaquetas associado à esponja cirúrgica em enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine** 38:397-405.

Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy (2005). **Dermatologic Surgery** 31:334-340.

Prado RP, Garcia SB, Thomazini JA, Piccinato CE (2012). Effects of 830 and 670 nm laser on viability of random skin flap in rats. **Photomedicine And Laser Surgery** 30:418-424.

Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM (2006). Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. **Acta Cirurgica Brasileira** 21:258-262.

Reis Filho NP, Ferreira MGAP, et al. (2017) Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 3:603-612.

Riggs J, Jennings JF, Friend EJ, Halfacree Z, Nelissen P, Holmes MA, Demetriou JL (2015) Outcome of full-thickness skin grafts used to close skin defects involving the distal aspects of the limbs in cats and dogs: 52 cases (2005–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 247: 1042-1047.

Scharf VF (2017) Free grafts and microvascular anastomoses. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 47:1249-1262.

Stanley BJ, Pitt KA, Weder CD, Fritz MC, Hauptman JG, Steficek BA (2013) Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery** 42:511-522.

Swaim SF (1990) Skin grafts. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 20:147-175.

Tong T, Simpson DJ (2012) Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. **Journal of Small Animal Practice** 53:520-525.

CAPÍTULO 3 – Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) e do óleo de girassol ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO – A enxertia cutânea pode ser definida pela transferência de um segmento de epiderme e derme de determinada localização anatômica para outra. Por ser avascular, depende da nutrição provida do leito receptor até que ocorra sua revascularização. O tecido de granulação é parte fundamental neste processo, porém nem sempre estará presente em momento inicial, diminuindo as taxas de sucesso da técnica. Algumas ferramentas têm sido estudadas como potenciais estimulantes da cicatrização de enxertos aplicados em feridas recém-criadas, fazendo desnecessária a espera pela granulação. O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia entre o laser de baixa intensidade (LBI) e a aplicação tópica de óleo de girassol ozonizado (OGO) na cicatrização de enxertos cutâneos autógenos aplicados em feridas recém-criadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Para isso utilizou-se 32 coelhos divididos em três grupos, sendo grupo controle (GC), grupo laser (GL) e grupo óleo ozonizado (GO₃). Os tratamentos foram aplicados logo após o procedimento cirúrgico e repetidos no 3º e 7º dia pós-operatório. As amostras foram analisadas por microscopia e imunohistoquímica. Os animais do grupo GL apresentaram melhores resultados, tanto nos critérios microscópicos, como quantidade de inflamação, integração do enxerto, reepitelização e presença de necrose, como na quantidade de novos vasos formados. Nos animais GO₃, houveram indícios de maceração, o que resultou em menor taxa de sucesso do enxerto, incluindo interferência na neoangiogênese. Porém, a evolução da cicatrização do GC foi inferior as demais, sendo a LBI e o OGO capazes de contribuir para a integração de enxertos cutâneos em coelhos.

Palavras-chave: cicatrização, enxertia, laserterapia, ozonioterapia

Introdução

A enxertia cutânea pode ser definida pela transferência de um segmento de epiderme e derme de determinada localização anatômica para outra. Portanto, trata-se de uma técnica oportuna em situações em que os defeitos se localizam em áreas que escassez de pele adjacente impedindo o fechamento primário da ferida ou a mobilização de retalhos (Swaim, 1990; Fowler, 2006).

O enxerto é um fragmento cutâneo avascular e, para que sua sobrevivência seja garantida até sua revascularização no leito receptor, alguns fatores clínicos são essenciais. Além de ausência de tecido necrótico, infecção e corpos estranhos, a presença de tecido de granulação saudável é um dos fatores que, historicamente, é citado como primordial para que se alcance o resultado esperado na técnica de

enxertia, em animais domésticos (Swaim,1990; Fowler, 2006; Miraliakbari; Mackay, 2006). Todavia, alguns estudos sugerem que a aplicação do enxerto em leito de granulação resulta em pior revascularização em comparação com os aplicados em ferida fresca (Jensen, 1959; Bauer; Pope, 1986); motivo não justificado por nenhum dos estudos revisados. Além disso, Tong e Simpson (2012) inferiram que o enxerto pode ser aplicado imediatamente após a criação do defeito, porém, o mesmo estudo demonstrou que todos os casos tiveram necrose parcial do enxerto. Portanto, certas vezes se faz necessário o preparo da ferida por segunda intenção, previamente à realização da técnica, o que requer grande disponibilidade e cuidado por parte do tutor, além de onerar o tratamento (Miraliakbari; Mackay 2006).

Algumas ferramentas têm sido estudadas como potenciais estimulantes da cicatrização de enxertos aplicados em feridas recém-criadas. Opções como o plasma rico em plaquetas e o laser de baixa intensidade (LBI) se mostram eficazes e permitiram a aplicação do enxerto de forma precoce (Reis Filho et al., 2017; Pazzini et al., 2018). Dentre as terapias que tem se destacado na cicatrização de feridas está a ozonioterapia. Ademais, é uma técnica aplicada em uma ampla gama de utilização, como processos infecciosos, controle de dor articular e inflamações. Entretanto na Medicina Veterinária os estudos ainda são escassos, mas representam um futuro promissor (Martinez-Sanches, et al., 2005; Elvis; Ekta, 2011).

O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia entre LBI e a aplicação de óleo de girassol ozonizado (OGO) como potenciais estimulantes da cicatrização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

Material e Métodos

A pesquisa foi executada 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. A metodologia deste experimento respeitou as diretrizes dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de

Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo número 03286/18, da mesma instituição.

Seleção dos animais para o procedimento cirúrgico e protocolo anestésico

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos. Os animais eram procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu, e foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais em condições de alimento e água *ad libitum*.

A pesquisa utilizou um total de 36 coelhos, divididos em três grupos distintos: 12 coelhos no grupo controle (GC), 12 no grupo laser (GL) e 12 no grupo óleo ozonizado (GO₃).

O protocolo anestésico utilizado foi composto por medicação pré-anestésica (MPA) composta por clorpromazina²⁰, na dose de 0,5 mg/kg e morfina²¹, 0,5 mg/kg, ambas na mesma seringa, aplicadas por via intramuscular (IM). Após 20 minutos, foi realizada a indução anestésica com isoflurano²², empregando máscara facial, seguida de manutenção anestésica com 3% de isoflurano diluído em 100% de oxigênio.

Procedimento cirúrgico

Após a indução anestésica, os animais foram preparados com ampla tricotomia na área doadora (AD), correspondente à região de terço distal da parede lateral do tórax direito, na altura da articulação costal, e também da área receptora (AR), localizada na face cranial do terço médio de rádio e ulna do membro torácico direito. Em seguida, as antissepsias, prévia e definitiva, foram realizadas, ambas com utilização de clorexidina degermante 2%²³ e álcool 70%²⁴.

Na AR foi criada uma ferida cutânea de espessura total, abrangendo pele e subcutâneo, com a utilização de lâmina de bisturi número 15, respeitando como base o formato de um molde plástico que media de 2cm x 2cm. O subcutâneo foi divulsionado de maneira romba até que todo o fragmento fosse removido e, posteriormente, descartado. O mesmo procedimento foi repetido na AD, porém o fragmento de pele foi utilizado como enxerto. Toda a porção subcutânea do enxerto

²⁰ Amplictil® 25mg/5mL, Aventis

²¹ Dimorf® 10mg/mL, Cristália

²² Isoforine® 100mL, Cristália

²³ Riohex® 2%, Rioquímica

²⁴ Álcool Líquido 70%, Tupi

foi removida por secção 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, então, posicionado na ferida da AR e suturado junto às bordas, utilizando pontos simples separados e fio de sutura náilon 3-0. A AD foi suturada com pontos em padrão simples contínuo utilizando náilon 3-0.

Tanto na ferida cirúrgica da AR como da AD foram realizados curativos com bandagem não aderente, compostos por gaze estéril umedecida com solução fisiológica e atadura de algodão, fixados com esparadrapo.

Grupo controle (GC): Os animais, aleatoriamente 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 laser (GL): Os animais deste grupo foram submetidos à LBI, 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 9 pontos distintos e pré-determinados de aplicação do laser. Foi utilizado o aparelho de laser Laserpulse Ibramed® modelo L42, com transdutor de comprimento de onda 660 nanômetros (nm) e 30 mW (miliwatt) de potência. A dose do laser utilizada foi de 4 J/cm² em onda contínua, durante 8 segundos em cada ponto pré-determinado. O protocolo de laser foi novamente aplicado nos animais no 3º e 7º dia de pós-operatório, durante a troca do curativo, após a limpeza da ferida.

Grupo óleo ozonizado (GO₃): Os animais deste grupo, foi aplicado de forma tópica o óleo de girassol purificado enriquecido com oxigênio ativo (O₃)²⁵, com índice de peroxidação de 600 mmol/mEq/kg sobre o enxerto, imediatamente após o término do procedimento cirúrgico. O volume total de 1 mL foi dividido em duas partes iguais, sendo uma metade aplicada no enxerto e, a outra, impregnada na gaze que compunha

²⁵ Ozone Life®, Lote 29/2017, validade Setembro de 2018

o curativo (Figura 3.1). O volume e sua distribuição foram determinados em estudo piloto prévio. Ademais, o OGO foi armazenado sob refrigeração em geladeira convencional.

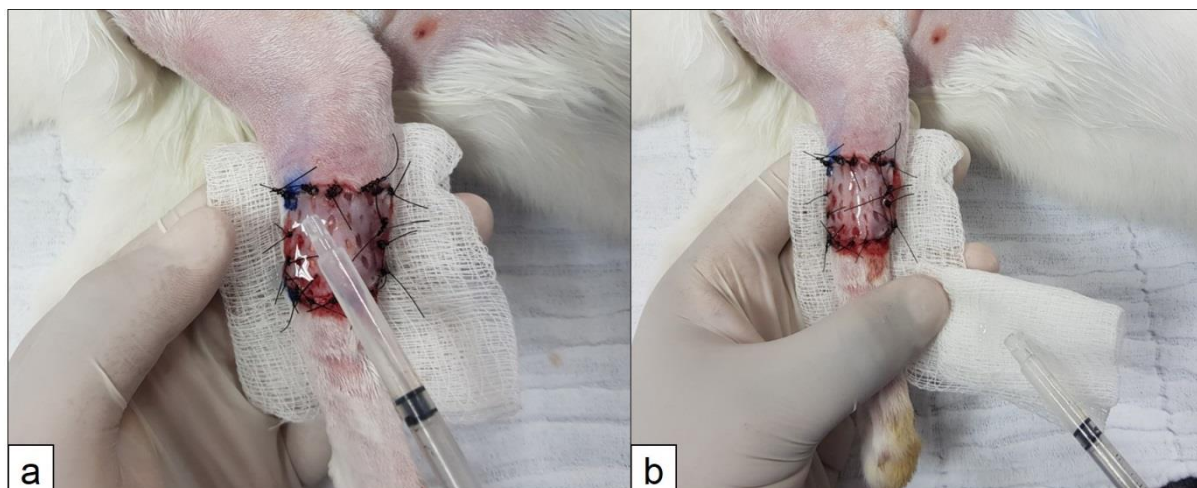


Figura 3.1. Fotografias representando a aplicação de óleo de girassol ozonizado em enxerto cutâneo em coelho. a) Demonstração da aplicação de 0,5 mL do óleo diretamente no enxerto. b) Demonstração da aplicação de 0,5 mL do óleo na gaze que compõe o curativo. Jaboticabal, 2019.

Protocolo terapêutico pós-operatório e troca de curativos e critérios de exclusão

No pós-operatório, os animais receberam enrofloxacina²⁶ (5 mg/kg a cada 12 horas, por via subcutânea) e cloridrato de tramadol²⁷ (3 mg/kg a cada 12 horas, por via subcutânea), ambos, durante 5 dias seguidos, além de meloxicam²⁸ (0,1 mg/kg, por via subcutânea) a cada 24 horas, nos três primeiros dias.

As trocas de curativos foram realizadas no 3^o e 7^o dia da cirurgia, em todos os grupos de tratamento. Após a retirada das bandagens, a ferida cirúrgica foi lavada gentilmente com solução fisiológica estéril e as sujidades removidas, com auxílio de gaze igualmente estéril. O curativo foi reaplicado, seguindo os mesmos princípios do período pós-operatório imediato. Nos animais dos grupos GL e GO₃, a aplicação da LBI e do óleo ozonizado ocorreram após a limpeza das feridas, antes da recolocação das bandagens, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

²⁶ Chemitril Injetável 2,5%®, Chemitec

²⁷ Tramadon® ampola 50 mg/mL, Cristália

²⁸ Maxican® 2%, Ourofino

Animais foram excluídos do estudo quando, durante o período de pós-operatório, houveram intercorrências relacionadas ao curativo, como queda da bandagem ou retirada pelo próprio animal.

Procedimento de eutanásia

O procedimento de eutanásia foi realizado no 15º dia do período pós-operatório, em todos os animais do experimento. Estes foram anestesiados com propofol²⁹ (dose de 10mg/kg) e, quando se certificava da ausência de reflexos corneal e pupilar, foi realizada a aplicação de 20 mL de cloreto de potássio³⁰ por via endovenosa para a indução de assistolia.

Processamento das amostras.

Imediatamente após a eutanásia, a porção cutânea enxertada foi totalmente removida da AR em bloco, incluindo uma pequena porção de pele não enxertada, afim de permitir análise da área de transição pele x enxerto (Apêndice A). As amostras foram acondicionadas em formol³¹ a 10%, na proporção 1:9, por 48 horas e transferidas para solução de álcool⁵ a 70%, até o momento do processamento.

As amostras foram clivadas e então inclusas em parafina. Os cortes realizados foram transversais de 4µ (micrometros), em micrótomo. Após o preparo, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

Avaliação microscópica.

Os parâmetros de inflamação, reepitelização, integração da pele com o enxerto e necrose foram analisados nas lâminas coradas com HE. As leituras foram realizadas por avaliador único, sem identificação de grupo, em microscópio³² utilizando objetivas de 4x, 20x e 40x, sequencialmente, seguindo os parâmetros descritos por Reis Filho et al. (2017) (Apêndice B).

Imuno-histoquímica

Para o estudo imunohistoquímico, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, com adesivos comerciais³³. Os cortes obtidos foram encaminhados para processamento com anticorpo CD31³⁴ na diluição

²⁹ Propovan® 10mg/mL, Cristália

³⁰ Cloreto de potássio 19,1%, Euquiplerx®

³¹ Formol 10%, Anidrol®

³² Nikon® E200

³³ 3-aminopropiltriétoxi-silano - Sigma Chemical® - C.O – United States

³⁴ Monoclonal, Dako®, JC70A

1:50 e recuperação enzimática³⁵ por 45 minutos, utilizando sistema de detecção³⁶ para leitura.

O índice angiogênico obtido, após marcação com CD31, foi determinado pela técnica de contagem microvascular (MCV), conforme preconizado por Maeda et al. (1995). A contagem dos vasos ocorreu em cinco campos, selecionados previamente, com elevada densidade vascular, no aumento de 400x, utilizando microscópio óptico de luz³⁷. Após a somatória do número de vasos, a contagem final foi expressa a média de vasos em cada caso estudado.

Análise estatística.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de correspondência 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 as referências para avaliar os efeitos dos diferentes grupos de tratamentos. Além disso, os resultados da avaliação microscópica também foram expostos em análise descritiva dos dados.

As análises das médias da contagem microvascular, foram submetidas ao teste de Tukey, processadas no software Statistica, versão 7 (StatSoft, 2004), para a comparação das médias entre os grupos de tratamento.

Resultados e Discussão

Respeitando os critérios de exclusão, quatro animais foram retirados do estudo por auto-trauma na região do enxerto. Desta forma, a distribuição entre os grupos foi: 10 coelhos no GC, 10 coelhos no GL e 12 no GO₃.

A evolução no processo cicatricial foi distinta nos três grupos de tratamento. De modo geral, os animais do grupo GL apresentaram melhores resultados ao final do período de 15 dias de pós-operatório. Foi notável que, logo no primeiro dia de troca de curativo, os enxertos do grupo GL apresentavam coloração rósea (Figura 3.2), indicando possível processo de revascularização precoce pois, somente entre o 5º e 7º dia do período pós-operatório ocorre o pico de atividade vascular, momento em que

³⁵ Pepsina Porcine Gastric Mucosa – Sigma life science® – United Kingdom

³⁶ Novolink Polymer Detection Systems® - Leica Biosystems New Castle Ltda- United Kingdom

³⁷ Nikon® E200

se observaria esse padrão de coloração (Most et al.; 2001). Já aqueles do grupo GC, evidenciaram palidez no 3º dia de pós-operatório, o que é natural na fisiologia de cicatrização de enxerto (Scharf, 2017). Porém evoluíram para degeneração na maior parte dos casos (Figura 3.2). Embora essas observações não tenham sido levantadas de forma quantitativa, acabam por revelar um parâmetro para análise de resultado que, apesar de subjetivo, traduzem o que o clínico se depara durante o acompanhamento dos enxertos.

Em muitos animais do grupo GO₃, foi possível a observação da formação de crosta acima do local da ferida, o que dificultava a distinção deste material como enxerto totalmente degenerado, ou como componente do próprio processo cicatricial. Todavia, independentemente deste achado, havia epitélio jovem abaixo da crosta (Figuras 3.2h, 3.2i e 3.3). A presença superficial de crostas é uma particularidade comum, secundária à feridas que apresentam moderado a alto grau de exsudação (Macphail; Fossum, 2019). Como esta característica não foi notada em outros grupos de tratamento, talvez o óleo de girassol ozonizado (OGO) tenha dificultado a evaporação do exsudato natural da cicatrização do enxerto, justificando tal fenômeno. Idealmente, um grupo de tratamento com óleo de girassol não ozonizado poderia confirmar essa suposição, mas o fato de estudos comprovarem maior capacidade de estímulo quando o óleo de girassol passa pelo processo de ozonização (Diaz et al., 2006; Kim et al., 2009) não justificou a utilização de mais animais para este estudo.

Além da crosta, era possível também a observação de áreas opacas ou esbranquiçadas com aparência úmida, compatíveis com maceração tecidual no grupo GO₃(Figura 3.4). Zeng e Lu (2018) ressaltam que, o OGO age, por si só, como substância que proporciona umidade ao seu local de aplicação. Tal fator, associado à provável dificuldade de evaporação do exsudato e aos intervalos prolongados entre as trocas de curativos, levam a crer que a maceração pode ter ocorrido sobre os enxertos do GO₃.

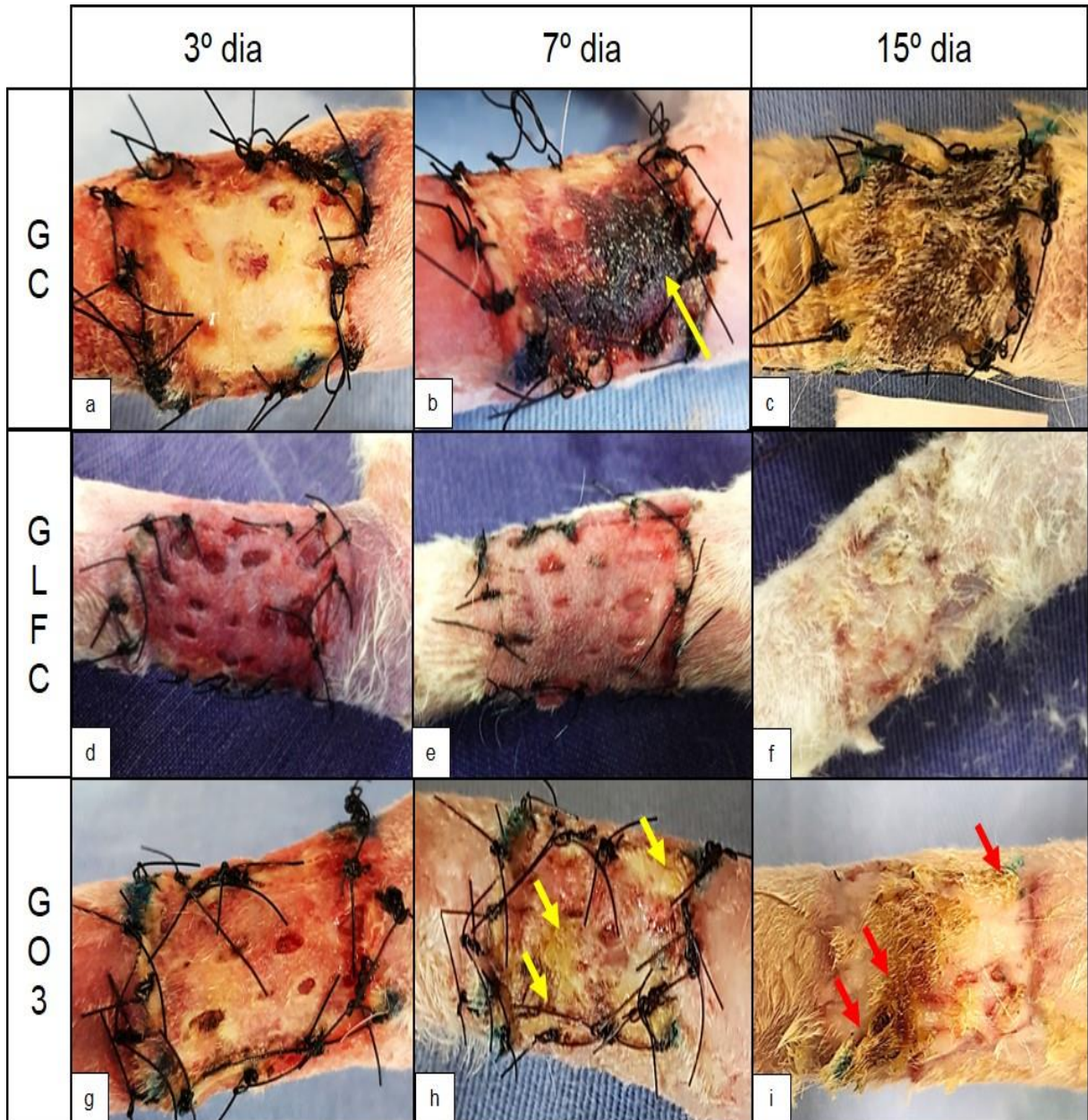


Figura 3.2. Fotografias ilustrativas de enxertos cutâneos em coelhos dos diferentes grupos de tratamento, durante os três momentos de troca do curativo. a) Aparência macroscópica do enxerto no 3º dia de pós-operatório (PO) de coelho do grupo controle (GC), notar coloração pálida. b) 7º dia de PO do grupo GC, notar degeneração de grande parte do enxerto (seta amarela). c) 15º dia de PO do grupo GC, observa-se enxerto totalmente degenerado. d) 3º dia de PO do grupo laser (GL), notar coloração rósea em momentos iniciais da cicatrização. e) 7º dia de PO do grupo GL. f) 15º dia de PO do grupo GL, notar excelente integração do enxerto. g) 3º dia de PO do grupo óleo ozonizado (GO₃). h) 7º dia de PO grupo GO₃, notar pequenas áreas pálidas com aparência úmida (seta amarela). i) 15º dia de PO do grupo GO₃, notar integração total do enxerto, porém há formação de crostas nos locais que correspondem as áreas pálidas na avaliação anterior (seta vermelha). Jaboticabal, 2019.

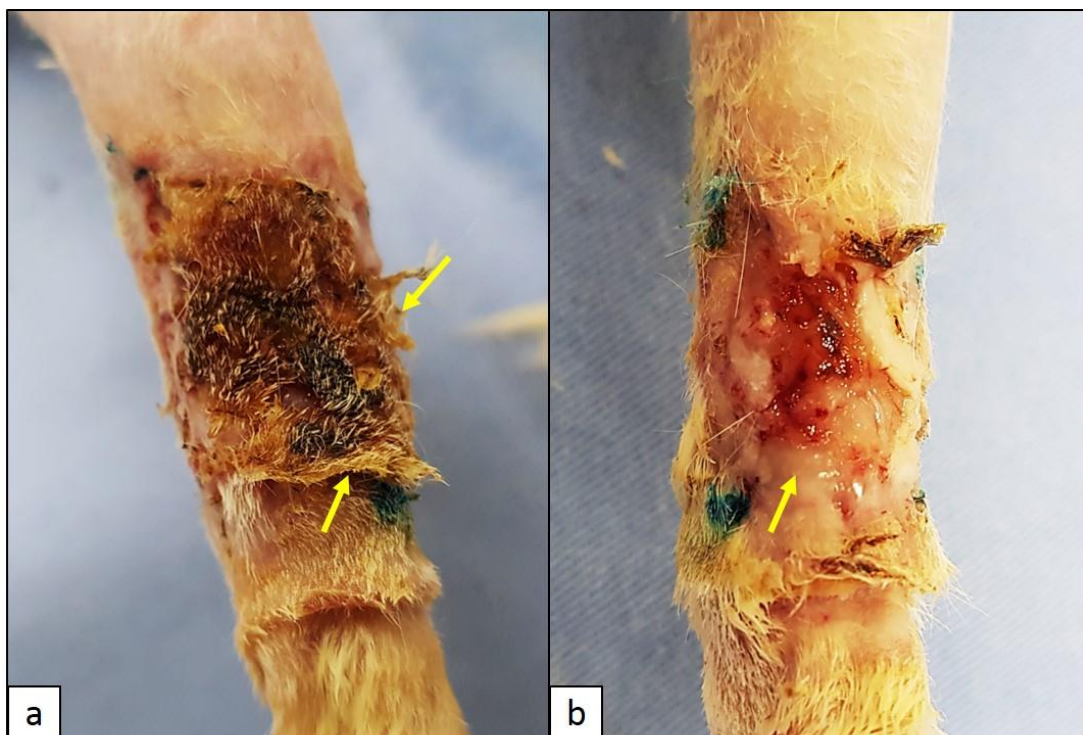


Figura 3.3. Fotografias ilustrativa de enxerto cutâneo em coelho do grupo óleo ozonizado no 15º dia do período de pós-operatório. a) Notar crosta sobre da área receptora (seta amarela). b) Notar área parcialmente reepitelizada abaixo da crosta removida (seta amarela). Jaboticabal, 2019.

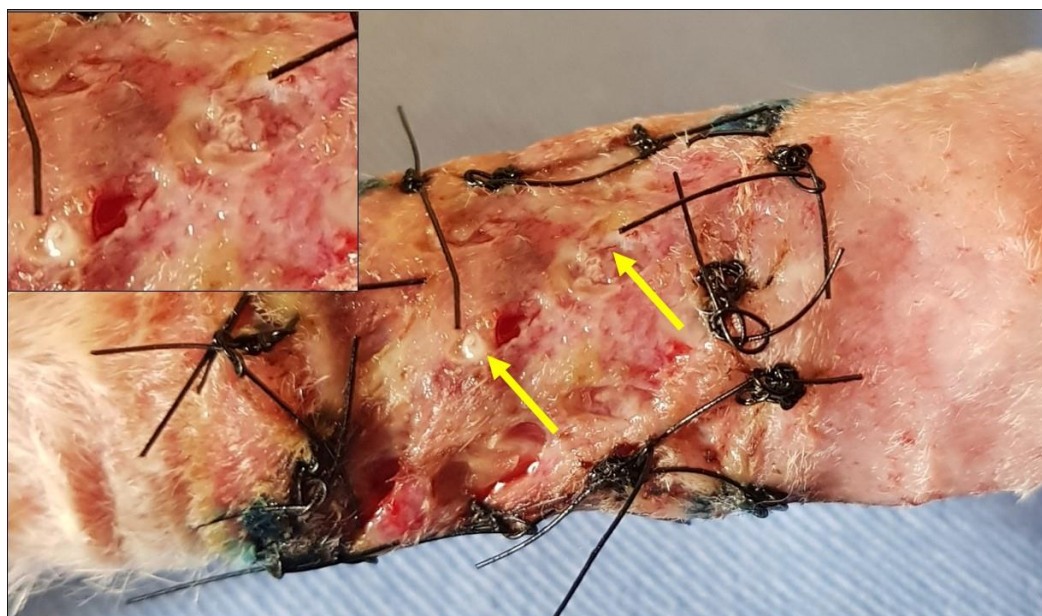


Figura 3.4. Fotografias ilustrativa de enxerto cutâneo em coelho do grupo óleo ozonizado no 7º dia do período de pós-operatório. Notar áreas esbranquiçadas próximas às fenestras (seta amarela) e aparência úmida do tecido, indícios de maceração tecidual. Jaboticabal, 2019.

Os resultados das análises microscópicas acabaram por confirmar o resultado observado clinicamente. A maioria dos animais apresentou sinais de inflamação discreta, porém, aqueles do GL foram aqueles que apresentaram a inflamação em menor quantidade (Gráfico 3.1, Figura 3.5). Chama a atenção que, 33,32% (n=4/10) dos animais do GO₃ apresentaram inflamação moderada ou acentuada (Gráfico 3.1, Figura 3.5). Em relação a reepitelização, novamente os enxertos do GL apresentaram melhores resultados, sendo que em 100% (n=10) dos casos, o fenômeno ocorreu de forma acentuada. Os grupos GC e GO₃, apresentaram evolução semelhante neste critério, porém os representantes do GC foram os únicos a receber classificação de reepitelização ausente em 20% dos casos (n=2).

No processo de reparo tecidual, a presença de inflamação interfere de forma negativa em diversos fenômenos da cicatrização, inclusive na reepitelização (Bohling; Swaim, 2018), o que pode explicar a semelhança destes resultados encontrados no GC e GO₃. Aparentemente, a área receptora do GC, composta de musculatura e tendões, não proporcionou ambiente ideal para a aplicação do enxerto cutâneo. Embora ainda controverso, diversos estudos demonstram a necessidade de um leito de granulação saudável para que o enxerto seja nutrido até o desenvolvimento vascular (Stanley et al., 2013; Erwin et al., 2016; Pazzini et al., 2016; Reis Filho et al., 2017;). Portanto, no GC, a degeneração do enxerto induziu a resposta inflamatória, interferindo na reepitelização. No GO₃, o excesso de umidade na ferida pode explicar os resultados observados. A maceração é um problema altamente relevante, porém subdiagnosticada na rotina clínica (Cutting; White, 2002). Sua presença estimula a reação inflamatória exacerbada, predispõe a colonização de bactérias e atrasa o processo cicatricial (Cutting; White, 2002; White; Cutting, 2003; Bishop et al., 2003)

Ao observar a relação enxerto x pele, nota-se 100% (n=10) de integração do fragmento nos animais do grupo GL, sendo que em 60% e 75% dos casos dos grupos GC e GO₃, respectivamente, também apresentaram integração satisfatória (Gráfico 3.1, Figura 3.5). A necrose também ocorreu de forma semelhante entre os grupos GC e GO₃, como frequência ligeiramente maior nos animais GC, porém esteve ausente em quase todos os casos do grupo GL (Gráfico 3.1, Figura 3.5). O laser demonstrou grande capacidade em estimular a área receptora, afim de proporcionar melhores condições para integração do enxerto, concordando com estudo prévio (Reis Filho et

al., 2017). A LBI age de forma importante no processo de reparo tecidual e no reestabelecimento do fluxo sanguíneo em tecidos isquêmicos, contribuindo de forma significativa para a diminuição da necrose (Prado et al., 2012). Estas são características desejáveis, pois o enxerto depende que o processo de regeneração supere o degenerativo, já que, quando destacado de sua vascularização natural, ocorre o início de um processo de degeneração, até a nova circulação sanguínea e linfática formada (Scharf, 2017).

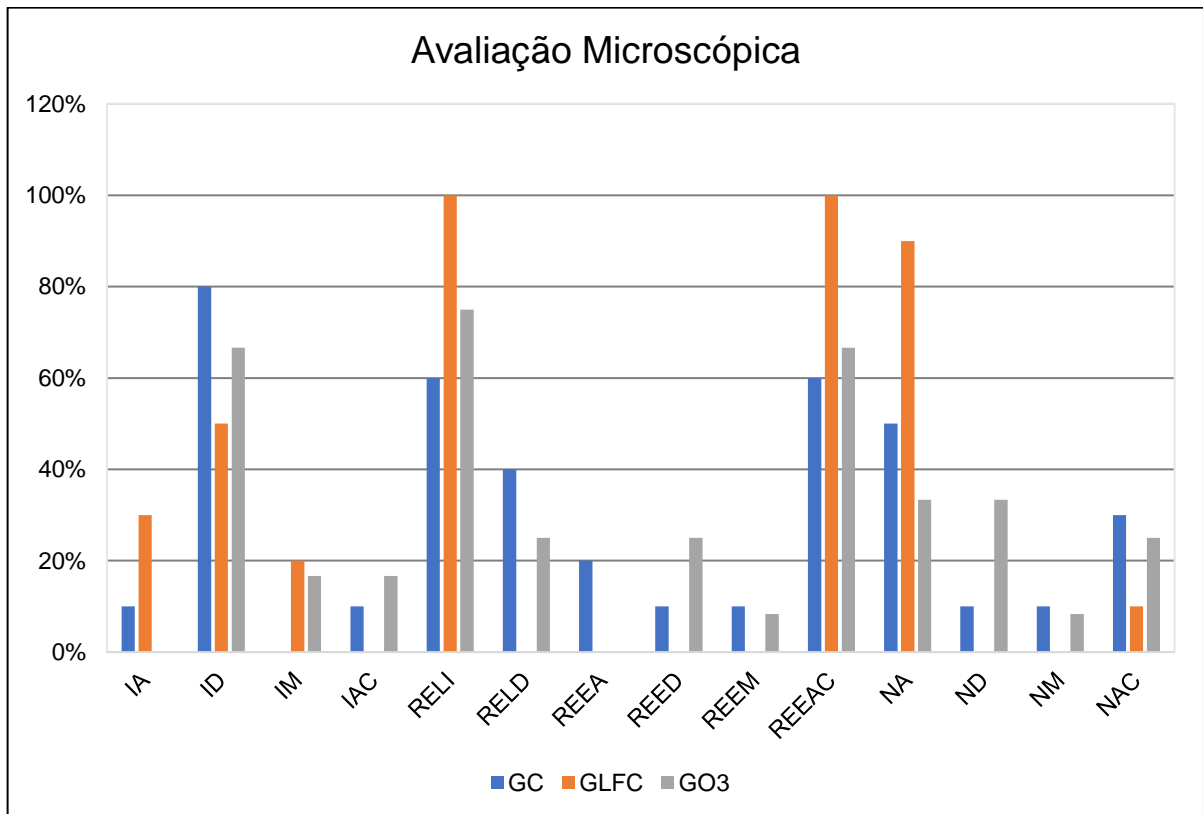


Gráfico 3.1 Média percentual dos parâmetros da avaliação microscópica em cada grupo de tratamento dos coelhos submetidos à enxertia cutânea. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC) grupo controle (GC); grupo laser (GL); grupo óleo ozonizado (GO₃). Jaboticabal, 2019.

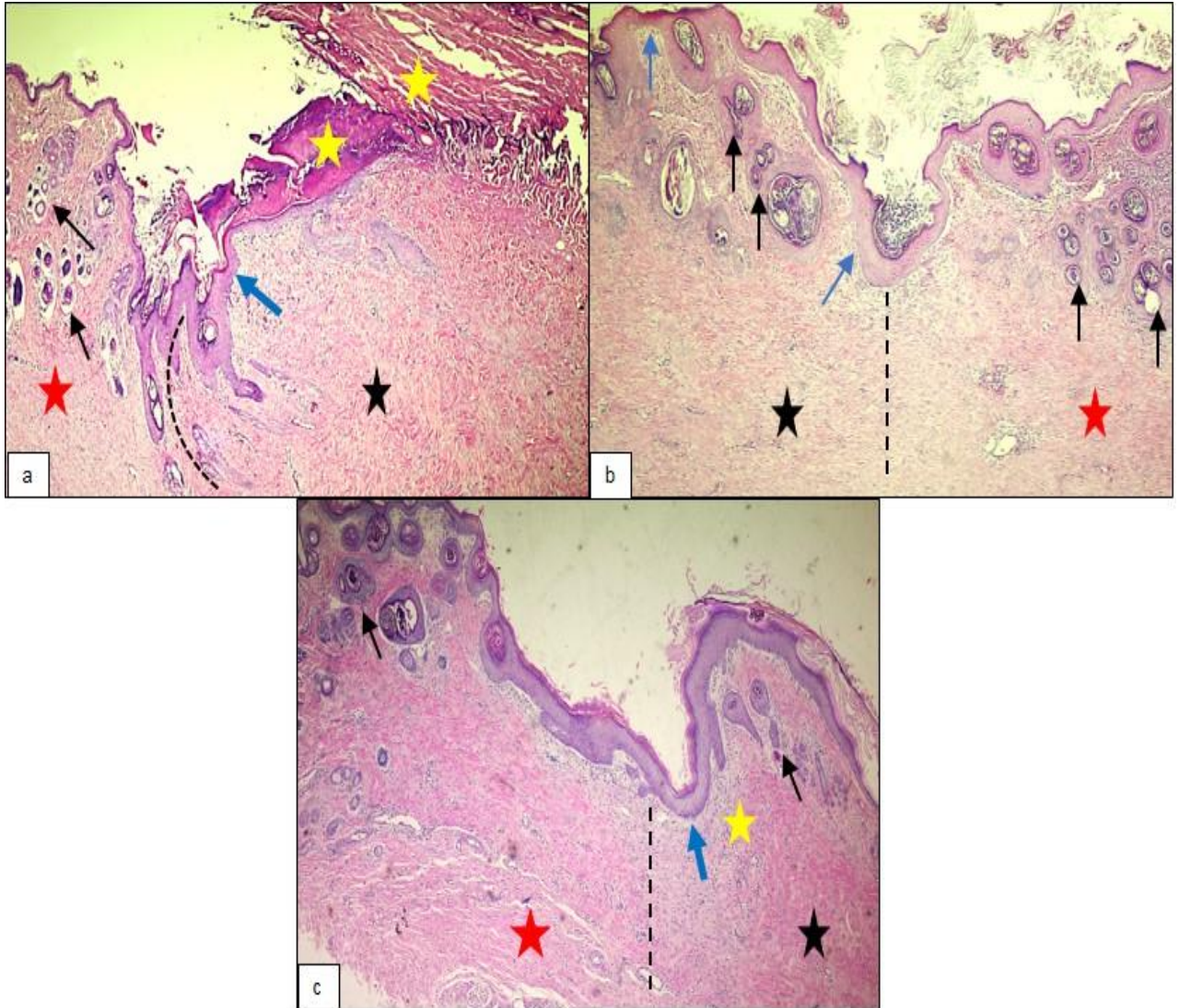


Figura 3.5. Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia. a) Área de transição (pontilhado) entre a epiderme original (estrela vermelha), com os anexos cutâneos (seta preta) e o segmento reepitelizado (seta azul) associado à proliferação de colágeno (estrela preta). Na superfície epidermal verifica-se o enxerto desvitalizado e não integrado à região receptora (estrela amarela / grupo controle). b) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e área de reepitelização (seta azul), associada à proliferação de colágeno (estrela preta), com integração completa do enxerto cutâneo e presença de anexos cutâneos tanto na área enxertada como na pele original (seta preta/ grupo laser). c) transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e área de intensa reepitelização (seta azul), associada à proliferação de colágeno (estrela preta) com integração completa do enxerto cutâneo e presença de anexos cutâneos (seta preta). Notar área de moderado infiltrado inflamatório (estrela amarela / grupo óleo ozonizado). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2019.

A análise de correspondência múltipla, aplicada nos resultados obtidos nos diferentes tratamentos, permitiu a identificação de uma categoria específica nos animais do grupo GC. Esta diz respeito à presença de REEA, REED, RELD, NAC e IAC (Figura 3.6). A correspondência foi significativa estatisticamente ($p < 0,05$; Quadro 3.1). Este resultado reforça fortemente o insucesso da aplicação do enxerto em ferida sem tecido de granulação. Entretanto, também demonstra que, apesar de nenhuma correspondência específica, a evolução dos enxertos dos animais do GL e GO₃ foi diferente do GC. Assim podemos inferir que tanto a LBI como o OGO foram importantes adjuvantes na cicatrização dos enxertos em nosso estudo.

Até onde se tem conhecimento, há apenas um relato de caso (Shah; Shyam; Shah, 2011) e um estudo (Turcic et al., 1995) com a utilização da ozonioterapia em enxertos cutâneos, ambos em humanos. Esperava-se evolução melhor dos pacientes do GO₃, já que, respostas promissoras têm sido demonstradas na área da cirurgia reconstrutiva, como na diminuição da necrose em retalhos cutâneos (Kirkil et al., 2016). Desta forma, acreditamos que os resultados obtidos aqui, tiveram interferência pelo ozônio ter sido aplicado junto ao óleo de girassol e causado maceração. Fica a cargo de novos estudos a comprovação da sua real eficácia em enxertos.

Outros dois grupos de categorias foram identificadas, porém são independentes do grupo de tratamento. A característica de NAC apresenta alta correspondência com RELD, REEA, REED e IAC ($p < 0,05$; Quadro 3.1), e NM com REEM ($p < 0,05$; Quadro 3.1). Embora estes achados não tenham relação direta com nenhum grupo, demonstram que, os parâmetros microscópicos indicativos de falha do enxerto apresentaram alto grau de correlação, reforçando a confiabilidade da metodologia utilizada para análise neste estudo.

Analisou-se, também, a formação de novos vasos no 15^o dia de pós-operatório pelo método de imuno-histoquímica. Foi possível visualizar densidade vascular claramente mais abundante nos animais do grupo GL, quando comparado aos outros grupos de tratamento (Figura 3.7). Esta observação se repete quando analisamos a MCV, onde o grupo GL apresentou média superior (\bar{x} 25,76) comparado aos demais grupos, GC (\bar{x} 24,06) e GO₃ (\bar{x} 18,01667) (Gráfico 3.2). Houve diferença estatística para $p < 0,10$ entre os grupos GL e GO₃ (Tabela 3.1).

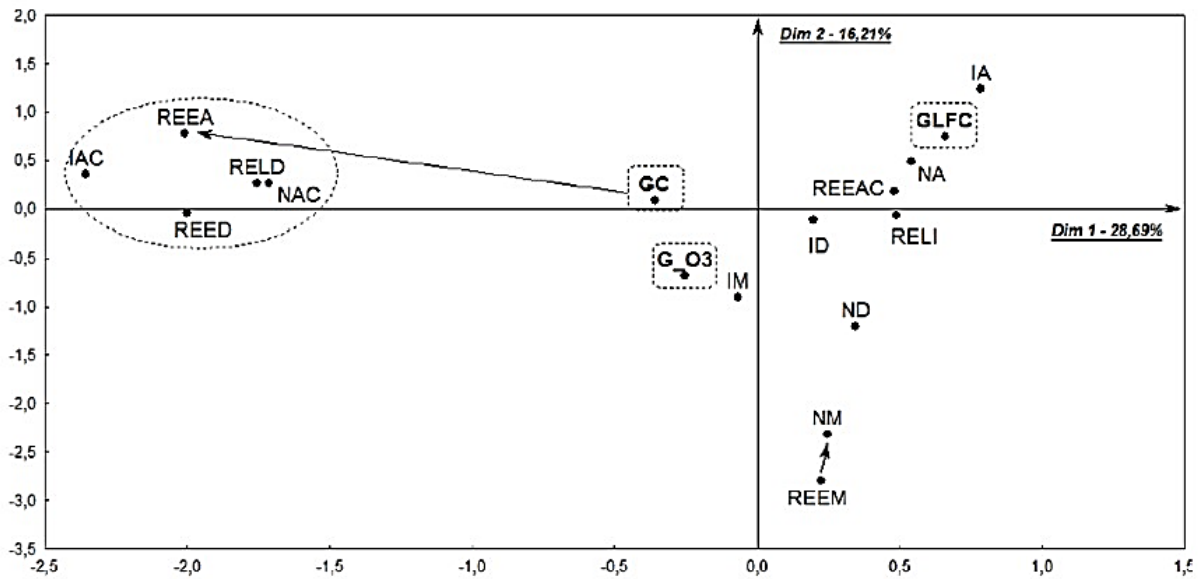


Figura 3.6. Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla dos achados microscópicos entre todos os grupos de tratamento de enxerto cutâneo em coelhos. Os parâmetros circulados apresentaram associação estatisticamente significativa com o grupo controle, pois estão distantes do eixo zero do mapa. Observar correspondência entre os parâmetros necrose moderada e reepitelização moderada, além da ausência de associações com o grupo laser e óleo ozonizado. Legenda: inflamação ausente (IA); inflamação discreta (ID); inflamação moderada (IM); inflamação acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC); grupo controle (GC); grupo laser (GL) e grupo óleo ozonizado (G_O3). Jaboticabal, 2019.

	GC	GLFC	G_O3	IA	ID	IM	IAC	RELI	RELD	REEA	REED	REEM	REEAC	NA	ND	NM
GC																
GLFC	-1,768															
G_O3	-1,936	-1,936														
IA	-0,224	1,565	-1,225													
ID	0,561	-0,61	0,045	-1,62												
IM	-1,118	0,671	0,408	-0,707	-1,62											
IAC	0,065	-0,968	0,825	-0,612	-1,403	-0,612										
RELI	-0,648	0,783	-0,122	0,495	0,393	-0,071	-1,531									
RELD	1,225	-1,479	0,231	-0,935	-0,744	0,134	2,893	-2,339								
REEA	1,739	-0,791	-0,866	-0,5	-0,273	-0,5	1,876	-1,25	2,362							
REED	-0,224	-1,118	1,225	-0,707	-1,003	0,707	2,654	-1,768	3,341	-0,5						
REEM	0,474	-0,791	0,289	-0,5	-0,273	1,5	-0,433	0,35	-0,661	-0,354	-0,5					
REEAC	-0,548	0,913	-0,333	0,577	0,567	-0,577	-1,5	0,981	-1,855	-1,225	-1,732	-1,225				
NA	-0,264	1,423	-1,058	1,167	0,055	-0,167	-1,299	0,783	-1,48	-1,061	-1,5	-1,061	1,225			
ND	-0,45	-1,25	1,552	-0,791	0,949	-0,791	-0,685	0,553	-1,046	-0,559	-0,791	1,23	0,129	-1,677		
NM	0,474	-0,791	0,289	-0,5	-0,273	1,5	-0,433	0,35	-0,661	-0,354	-0,5	2,475	-0,408	-1,061	-0,559	
NAC	0,549	-0,803	0,231	-0,935	-0,744	0,134	2,893	-1,911	3,611	2,362	3,341	-0,661	-1,855	-1,984	-1,046	-0,661

Quadro 3.1. 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 íntegra (RELI); relação enxerto x pele degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); reepitelização discreta (REED); reepitelização moderada (REEM); reepitelização acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); necrose discreta (ND); necrose moderada (NM); necrose acentuada (NAC); grupo controle (GC); grupo laser (GL) e grupo óleo ozonizado (G_O3). Jaboticabal, 2019.

Por meio de modelos experimentais, é comprovado que, tanto a LBI como o OGO, são capazes de estimular a neovascularização em tecidos isquêmicos de forma eficiente (Cury et al., 2013; Kirkil et al., 2016). Em nosso estudo, esta observação foi possível apenas no GL que, desde a observação de coloração rósea logo no 3º dia do período pós-operatório, até a contagem MCV pela imuno-histoquímica, se mostrou eficiente em estimular a formação de novos vasos. O GO₃ foi inferior ao GL, mas sem diferença comparado ao GC. Kim et. al (2009) constataram eficácia do OGO em promover a aceleração da cicatrização em feridas agudas criadas experimentalmente. Este estudo notou aumento da síntese de colágeno, da proliferação de fibroblastos, além de alta expressão de fatores de crescimento como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, TGF- β (fator de transformação de crescimento beta), e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Portanto, mais uma vez a maceração pode explicar a ausência de estímulo angiogênico, pois a hiper-hidratação de células epidérmicas diminuem sua atividade e metabolismo (Cutting; Withe, 2002).

A cicatrização de feridas em ambiente úmido tem sido relatada como eficaz há mais de 60 anos. Porém, somente nos últimos anos, o desenvolvimento de curativos capazes de manter a ferida na umidade ideal, tornaram este conceito um dos mais relevantes no manejo de feridas abertas. Portanto somente a umidade controlada é capaz de favorecer o processo cicatricial sem promover os efeitos deletérios da maceração (Reis Filho et al., 2014).

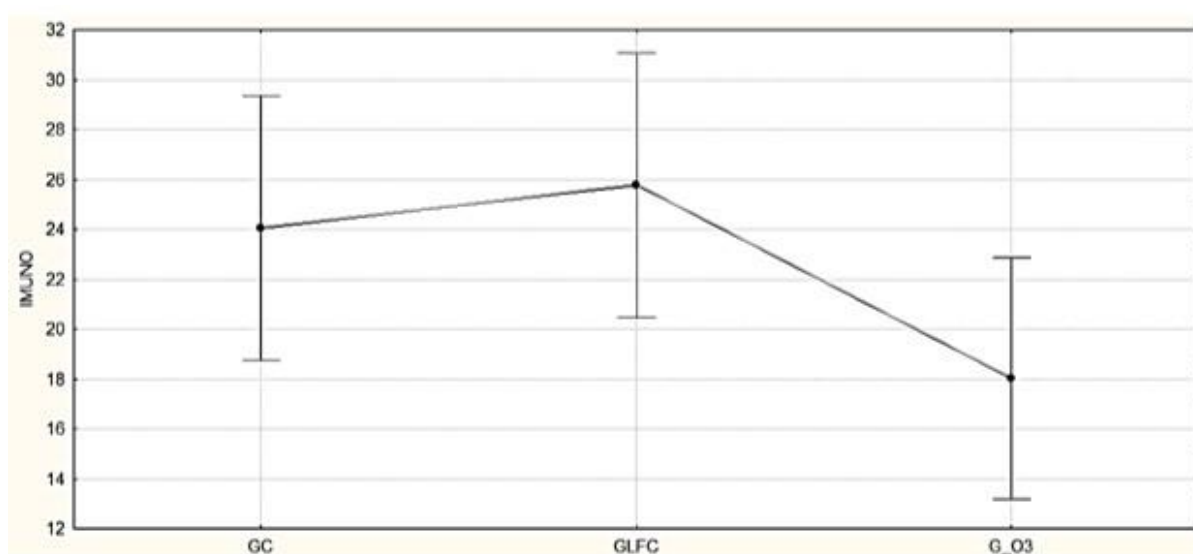


Gráfico 3.2. Gráfico das médias da contagem microvascular (MCV) por meio de técnica de imuno-histoquímica (CD31) em coelhos submetidos a técnica de enxertia cutânea em diferentes grupos de tratamentos. Legenda: IMUNO (índice de MCV); grupo controle (GC); grupo laser (GL) e grupo óleo ozonizado (G_O3). Jaboticabal, 2019.

Tabela 3.1. Teste de comparações múltiplas de médias (LSD – Fisher) entre todos os tratamentos da enxertia cutânea em coelhos. Legenda: grupo controle (GC); grupo laser (GL); grupo óleo ozonizado (GO₃). Jaboticabal, 2019.

GRUPO	IMUNO-MÉDIA	p<0,10
GO ₃	18,01	a
GC	24,06	ab
GL	25,76	b

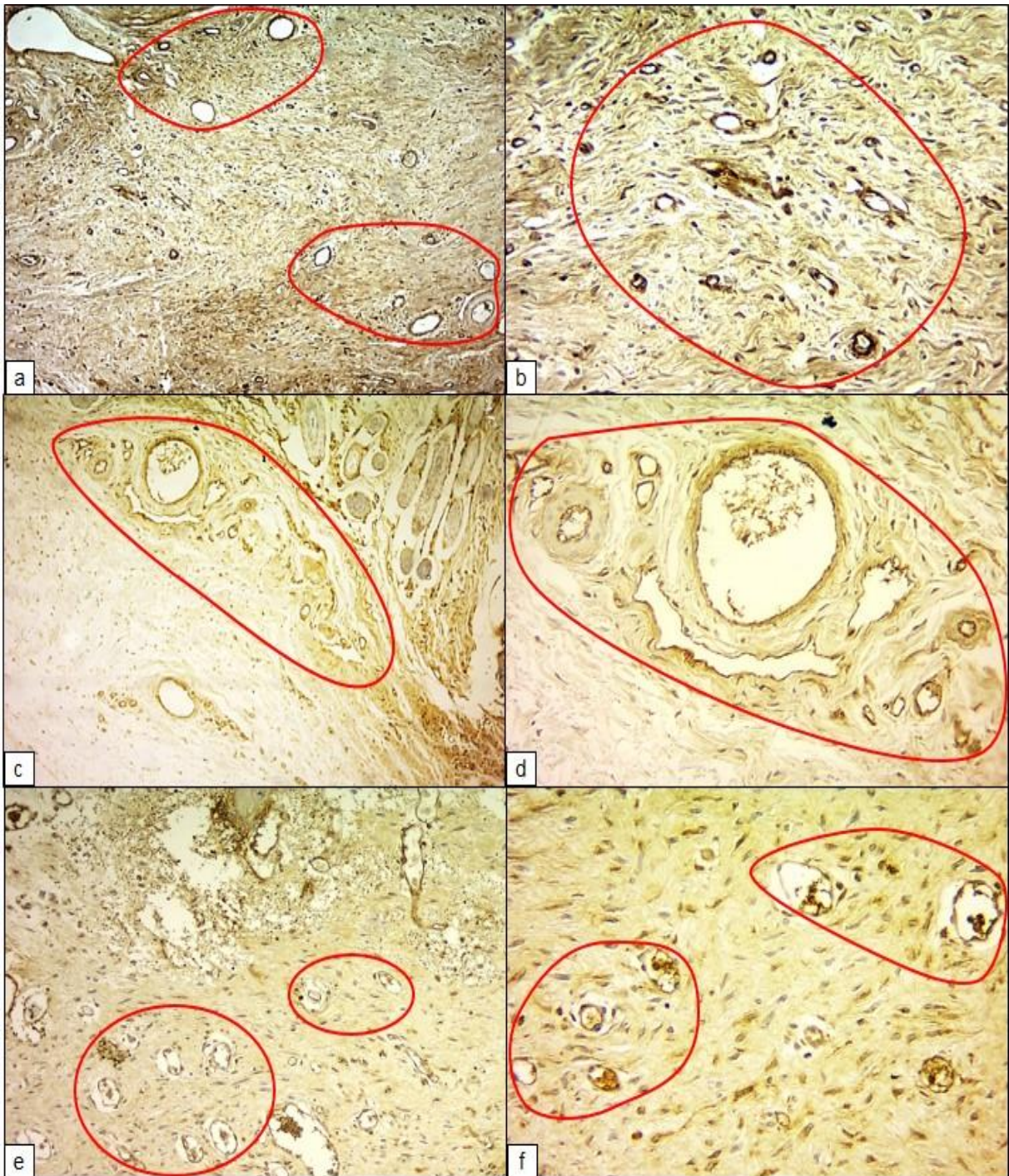


Figura 3.7. Fotomicrografia de pele de coelho submetido à técnica de enxertia nota-se a coloração marrom mais escura representando vasos sanguíneos. As áreas demarcadas em vermelho representam maior concentração de vasos. a) Grupo controle, objetiva de 10x. b) Grupo controle, objetiva de 20x. c) Grupo laser, objetiva 10x. d) Grupo laser, objetiva 20x. e) Grupo óleo ozonizado, objetiva 10x. f) Grupo óleo ozonizado, objetiva 20x. Coloração imuno-histoquímica, anticorpo CD31. Jaboticabal, 2019.

Conclusão

Conclui-se com este estudo que, a ferida recém-criada não proporcionou um ambiente capaz de nutrir o enxerto cutâneo em coelhos, até que ocorra sua revascularização. Tanto a LBI como o OGO são terapias adjuvantes que evitam a degradação do enxerto e contribuem para resultados melhores. Porém, o óleo de girassol pode predispor a maceração tecidual interferindo na neoangiogênese, mostrando-se inferior à LBI para este fim. Por sua vez, a LBI foi eficiente na estimulação da cicatrização do enxerto cutâneo em ferida recém criada em coelhos.

Referências³⁸

Bauer MS, Pope ER (1986) The effects of skin graft thickness on graft viability and change in original graft area in dogs. **Veterinary Surgery** 15:321–324.

Bishop SM, Walker M, Rogers AA, Chen WYJ (2003). Importance of moisture balance at the wound-dressing interface. **Journal of Wound Care** 12:125-128.

Bohling MW, Swaim SF (2018) Skin grafts. In: Johnston SA, Tobias KM (Eds.) **Veterinary Surgery Small Animal**. St. Louis, p. 3952-4002.

Cury V, Moretti AIS, et al. (2013). Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 125:164-170.

Cutting KF, White RJ (2002). Maceration of the skin and wound bed 1: its nature and causes. **Journal of Wound Care** 11:275-278.

Díaz MF, Hernández R, Martínez G, Vidal G, Gómez M, Fernández H, Garcés R (2006). Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 17:403-407.

³⁸ Baseado em: NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE DISSERTAÇÃO E TESE DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP, CÂMPUS DE JABOTICABAL, versão 2018.

Elvis AM, Ekta JS (2011) Ozone therapy: A clinical review. **Journal Of Natural Science, Biology, And Medicine** 2:66-70.

Erwin G, Handharyani E, Noviana D (2016). Subjective and objective observation of skin graft recovery on Indonesian local cat with different periods of transplantation time. **Veterinary World**, 9(5), 481-486.

Fowler D (2006) Distal limb and paw injuries. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 36:819–845.

Jensen, EC (1959) Canine autogenous skin grafting. **American Journal of Veterinary Research** 20:898–908.

Kim HS, Noh SU, et al. (2009). Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science** 24:368-374.

Krikil C, Yigit MV, Özercan IH, Aygen E, Gültürk B, Artas G (2016). The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. **Advances in Skin & Wound Care** 29:322-327.

MacPhail C; Fossum TW (2019) Surgery of the Integumentary System. In: Fossum TW (Ed.) **Small Animal Surgery**. Philadelphia, p.179-265.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T., Kondo Y, Sowa M (1995) Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British Journal Of Cancer** 72:319-326.

Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al (2005). **Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. European Journal of Pharmacology** 523:151-161.

Miraliakbari R, Mackay DR (2006) Skin Grafts. **Operative Techniques in General Surgery** 8:197-206.

Most D, Efron DT, et al. (2001) Differential cytokine expression in skin graft healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Plastic and Reconstructive Surgery** 108:1251–1259.

Pazzini JM, Serafim EL, et al. (2018) Surgical sponge associated with platelets rich plasma in skin mesh grafts and layer in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 70:1339-1348.

Pazzini JM, Serafim, et al. (2016) Emprego de plasma rico em plaquetas associado à esponja cirúrgica em enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine** 38:397-405.

Prado RP, Garcia SB, Thomazini JA, Piccinato CE (2012). Effects of 830 and 670 nm laser on viability of random skin flap in rats. **Photomedicine And Laser Surgery** 30:418-424.

Reis Filho NP, Ferreira MGAP, et al. (2017) Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 3:603-612.

Reis Filho NP, Mendes DS, Souza MSB, Arias MVB (2014) Uso de coberturas no tratamento de feridas de cães e gatos. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária** 12:424-435.

Scharf VF (2017) Free grafts and microvascular anastomoses. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 47:1249-1262.

Shah P, Shyam AK, Shah S (2011) Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. **Indian Journal of Orthopaedics** 45:376-382.

Stanley BJ, Pitt KA, Weder CD, Fritz MC, Hauptman JG, Steficek BA (2013) Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery** 42:511-522.

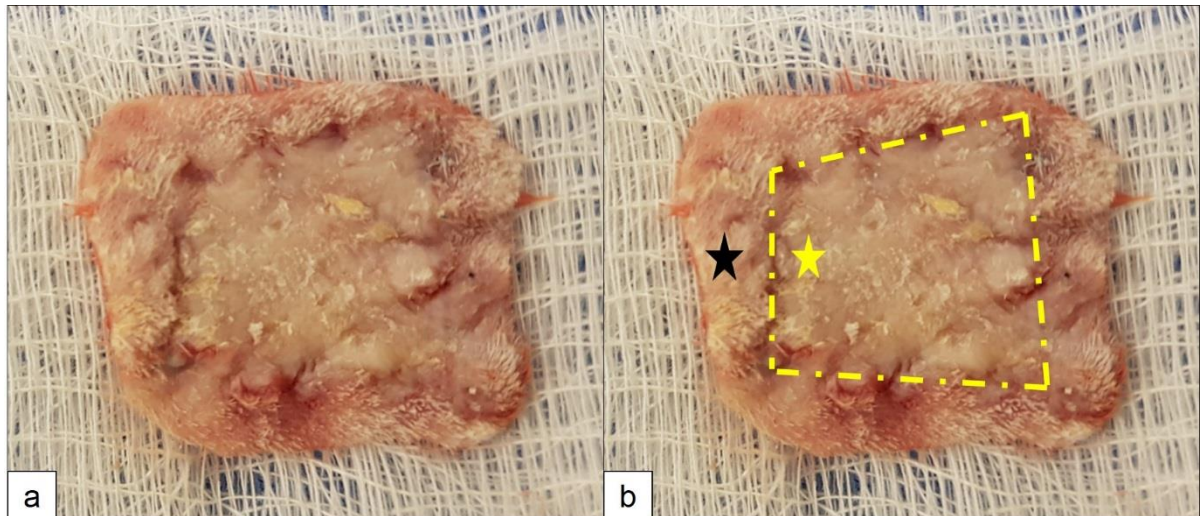
Swaim SF (1990) Skin grafts. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 20:147-175.

Tong T, Simpson DJ (2012) Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. **Journal of Small Animal Practice** 53:520-525.

Turčić J, Hancević J, Antoljak T, Zic R, Alfirević I (1995). Effects of ozone on how well split-thickness skin grafts according to Thiersch take in war wounds. Results of prospective study. **Langenbecks Archiv fur Chirurgie** 380:144-148.

Zeng J, Lu J (2018) Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International Immunopharmacology** 56:235-241.

APÊNDICES



Apêndice A. Fotografia ilustrativa do material coletado logo após a eutanásia dos coelhos que receberam enxertia cutânea. a) Notar o fragmento resultante da coleta, abrangendo todo o enxerto e uma parcela de tecido original. b) Observar a mesma imagem de a, porém com esquema ilustrativo onde a linha pontilhada em amarelo representa os limites do enxerto, área correspondente ao enxerto (estrela amarela) e área de pele original (estrela preta). Jaboticabal, 2019.

Apêndice B. Parâmetros microscópicos adotados para avaliação da epitelização de enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), nas colorações de Hematoxilina e Eosina e tricrômico de Masson, utilizados em todos os grupos experimentais. (Fonte: Reis Filho et al., 2017)

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO	INDICADORES
INFLAMAÇÃO	AUSENTE (IA)	Células inflamatórias, como heterófilos e linfócitos, não visualizadas no campo óptico.
	DISCRETA (ID)	Células inflamatórias evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado inflamatório.
	MODERADA (IM)	Células inflamatórias apareciam com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado.
	ACENTUADA (IAC)	Células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.
RELAÇÃO ENXERTO X PELE	ÍNTEGRA (RELI)	Enxerto totalmente integrado e conectado à ferida.
	DEGENERADA (RELD)	Maior parte do enxerto desinserido de derme superficial.
REEPITELIZAÇÃO DO ENXERTO	AUSENTE (REEA)	Ausência de epitélio no campo óptico.
	DISCRETA (REED)	Epitelização incompleta, com predomínio da área não reepitelizada.
	MODERADA (REEM)	Epitelização incompleta, com predomínio da área reepitelizada.
	ACENTUADA (REEAC)	Reepitelização completa sobre o tecido conjuntivo.
PRESENÇA DE NECROSE NO ENXERTO	AUSENTE (NA)	Células do enxerto, em sua totalidade, não apresentavam sinais como picnose nuclear, cariólise e eosinofilia do citoplasma.
	DISCRETA (ND)	Sinais de necrose celular isolados.
	MODERADA (NM)	Sinais de necrose celular multifocal.
	ACENTUADA (NAC)	Sinais de necrose celular em toda a extensão do enxerto.
COLAGENIZAÇÃO	DISCRETA (CD)	0 a 33% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação.
	MODERADA (CM)	34 a 66% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação.
	ACENTUADA (CAC)	67 a 100% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação.