

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
dissertação será disponibilizado  
somente a partir de 28/08/2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM ENXERTOS CUTÂNEOS  
SUBMETIDOS À LASERTERAPIA EM RATOS**  
***(Rattus norvegicus albinus wistar)***

**Stella Habib Moreira**

Médica Veterinária

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM ENXERTOS CUTÂNEOS  
SUBMETIDOS À LASERTERAPIA EM RATOS**  
*(Rattus norvegicus albinus wistar)*

**Discente: Stella Habib Moreira**

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

**Coorientador (a): Dr. Rafael Ricardo Huppes**

**Coorientador (a): Dra. Josiane Moraes Pazzini**

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

**2019**

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M838a | <p>Moreira, Stella Habib</p> <p>Avaliação da angiogênese e resposta inflamatória em enxertos cutâneos... / Stella Habib Moreira. -- Jaboticabal, 2019</p> <p>64 p. : tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Andriago Barboza De Nardi<br/>Coorientadora: Josiane Moraes Pazzini</p> <p>1. Cirurgia. 2. Lasers. 3. Cirurgia plástica. I. Título.</p> |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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

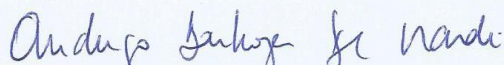
Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

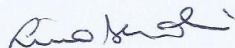
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM  
ENXERTOS CUTÂNEOS SUBMETIDOS À LASERTERAPIA EM RATOS  
(*Rattus norvegicus albinus wistar*)

**AUTORA:** STELLA HABIB MOREIRA  
**ORIENTADOR:** ANDRIGO BARBOZA DE NARDI  
**COORDENADOR:** RAFAEL RICARDO HUPPES  
**COORDENADORA:** JOSIANE MORAIS PAZZINI

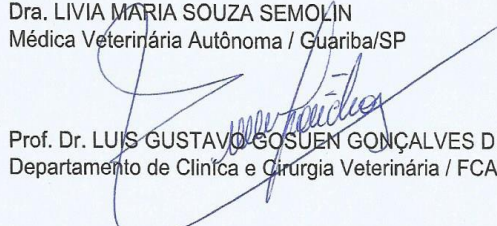
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA  
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dra. LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN  
Médica Veterinária Autônoma / Guariba/SP



Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSSUEN GONÇALVES DIAS  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2019

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Stella Habib Moreira, nascida em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais no dia 30 de julho de 1990. Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras, colando grau em 29 de dezembro de 2014. Residente em Clínica Cirúrgica de Animais de Companhia pelo Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais durante os anos de 2015 e 2016. Ingressante no Programa de Pós-Graduação pela UNESP, Câmpus Jaboticabal em março de 2017, sendo mestranda pelo Programa de Cirurgia Veterinária sob orientação do Professor Doutor Andrigo Barboza De Nardi e coorientação da Doutora Josiane Moraes Pazzini. Ingressante no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária pela UNESP, Câmpus Jaboticabal, iniciando em março de 2019, sob orientação do Professor Doutor Andrigo Barboza De Nardi.

## **Epígrafe**

“Sonhar grande dá o mesmo trabalho que sonhar pequeno”

Jorge Paulo Lemann

### **Dedicatória**

Aos meus pais e irmã que sempre batalharam comigo por cada sonho.

Também dedico a cada paciente que um dia pude ajudar e aprender.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meus caminhos e por renovar a cada dia Suas misericórdias e amor. Aos meus pais, Paulo e Lourdes, e minha irmã Ingrid, sem vocês nada seria possível na minha vida. Obrigada por toda ajuda, seja financeira ou numa simples ligação, aonde um “oi” ilumina o meu dia. Vocês me ensinaram honestidade e felicidade, lições preciosas para a vida.

Aos meus avós, em especial à “Vovó Minda” que aonde quer que esteja, estará cuidando de mim. Aos meus tios e primos por todo o incentivo e bons exemplos. Ao meu melhor amigo e irmão Caio Carvalho Bustamante, pela amizade, ótimas histórias e sorrisos sinceros.

Aos professores que passaram pela minha jornada de estudos, em especial ao professor Andriago Barboza De Nardi, por todo apoio e por me receber na UNESP, mesmo eu vindo como uma “desconhecida” e me permitiu ser sua orientada. O senhor é um exemplo de pessoa e profissional, obrigada por tudo. À Josiane Pazzini, por ser mais que uma coorientadora, uma grande amiga e alguém que me ensinou a batalhar mais ainda pelos meus sonhos. Ao professor Luis Gustavo Gosuen Goncalves Dias por me mostrar novos resultados na qualificação; professora Ana Lúcia Rosa Pascoli pela amizade; desde já agradeço a ajuda, aceite da banca e pela atenção de ambos. À Dra. Livia Semolin, pela disponibilidade. À professora Paola Castro Moraes pelo carinho e empréstimo do aparelho de laser. Ao professor Alexandre Hataka pela ajuda no período em que estive em Botucatu.

Quando moramos longe de casa, os amigos de perto se fazem família, seja para momentos de alegria, de desespero ou de saudades. E aqui em Jaboticabal encontrei grandes amigos e incentivadores. Obrigada a cada um que pude conviver e ser amiga. Em especial à Rafaela Bortolotti e Marla Frasson, pessoas iluminadas. À imensa ajuda do Filippo Bernardes, Caroline Kajiura, Jorge Gómes e Pedro Cassino.

Ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV), aonde encontrei excelentes profissionais e pessoas de bem, prontas para ajudar. Ao Hospital Veterinário, funcionários, pós-graduandos e residentes por toda ajuda e companheirismo.

À FAPESP/Capes pela concessão de bolsa de mestrado ao projeto, processo nº 2017/25951-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O presente trabalho foi realizado também o com apoio da Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Próxima etapa: o doutorado!

## SUMÁRIO

|                                                          | Página      |
|----------------------------------------------------------|-------------|
| <b>SUMÁRIO.....</b>                                      | <b>i</b>    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                        | <b>vi</b>   |
| <b>LISTA DE QUADROS.....</b>                             | <b>vii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                             | <b>viii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                | <b>01</b>   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                     | <b>02</b>   |
| <b>2.1 Enxertos Cutâneos.....</b>                        | <b>02</b>   |
| 2.1.1. Classificação e origem dos enxertos cutâneos..... | 02          |
| 2.1.2. Confeção do enxerto cutâneo.....                  | 03          |
| 2.1.3. Fases de cicatrização do enxerto cutâneo.....     | 04          |
| 2.1.4. Cuidados pós-operatórios.....                     | 05          |
| <b>2.2. Laserterapia.....</b>                            | <b>05</b>   |
| 2.2.1. Laserterapia de Baixa Intensidade.....            | 06          |
| 2.2.2. Mecanismo de ação.....                            | 07          |
| 2.2.3. Efeitos da laserterapia de baixa intensidade..... | 08          |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                 | <b>09</b>   |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                        | <b>09</b>   |
| 4.1. Instalações.....                                    | 09          |
| 4.2. Delineamento experimental.....                      | 10          |
| 4.3. Protocolo anestésico.....                           | 11          |
| 4.4. Procedimento pré-cirúrgico.....                     | 11          |
| 4.5. Procedimento cirúrgico .....                        | 12          |
| 4.6. Protocolo de laserterapia de baixa intensidade..... | 16          |
| 4.7. Avaliação macroscópica e coleta de material.....    | 17          |
| 4.8. Avaliação microscópica.....                         | 17          |
| 4.9. Análise estatística.....                            | 20          |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                | <b>20</b>   |
| <b>5.1. Avaliação macroscópica.....</b>                  | <b>20</b>   |
| 5.1.1. Exsudato.....                                     | 20          |
| 5.1.2. Coloração.....                                    | 21          |

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| 5.1.3. Edema.....                      | 22 |
| 5.1.4. Aspecto cosmético.....          | 23 |
| 5.2. Avaliação microscópica.....       | 24 |
| 5.2.1. Fibroblastos.....               | 24 |
| 5.2.2. Neutrófilos.....                | 24 |
| 5.2.3. Proliferação vascular.....      | 25 |
| 5.2.4. Necrose.....                    | 26 |
| 5.2.5. Hemorragia.....                 | 27 |
| 5.2. Macrófagos.....                   | 27 |
| 5.3. CD31.....                         | 28 |
| 5.4. COX-2.....                        | 29 |
| 5.5. Colagenização.....                | 29 |
| 5.5.1. Colágeno tipo I – vermelho..... | 29 |
| 5.5.2. Colágeno tipo III – verde.....  | 30 |
| 6. DISCUSSÃO.....                      | 31 |
| 7. CONCLUSÃO.....                      | 36 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                   | 36 |
| 7. APÊNDICE.....                       | 43 |
| Apêndice A.....                        | 44 |
| Apêndice B.....                        | 45 |
| Apêndice C.....                        | 46 |

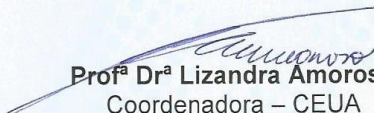
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da angiogênese e resposta inflamatória em enxertos cutâneos submetidos à laserterapia em ratos (*Rattus norvegicus albinus*)**”, protocolo nº 010401/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo 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 03 de Agosto de 2017.

|                     |                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 04/08/2017 a 01/08/2018                                          |
| Espécie / Linhagem  | Ratos ( <i>Rattus norvegicus albinus</i> linhagem Wistar albino) |
| Nº de animais       | 40                                                               |
| Peso / Idade        | 250 Gramas / Aproximadamente 56 dias                             |
| Sexo                | Machos                                                           |
| Origem              | UNESP – Campus Botucatu                                          |

Jaboticabal, 03 de agosto de 2017.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

**AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ENXERTOS  
CUTÂNEOS SUBMETIDOS À LASERTERAPIA EM RATOS  
(*Rattus norvegicus albinus wistar*)**

**RESUMO** – As técnicas reconstrutivas têm sido amplamente utilizadas na Medicina Veterinária. Com a intenção de reduzir complicações inerentes às técnicas reconstrutivas, são utilizadas terapias adjuvantes pós-operatórias como a laserterapia de baixa intensidade (LBI). Objetivou-se definir os efeitos da laserterapia de baixa intensidade sobre a cicatrização, inflamação e vascularização de enxertos cutâneos em intervalos de tempo aplicáveis à rotina cirúrgica veterinária. Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*), sendo cada animal submetido à enxertia cutânea autógena em região interescapular, sendo distribuídos de forma aleatória em cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) de acordo com a dose de 6 J/cm<sup>2</sup> ou 10 J/cm<sup>2</sup> a cada 3 ou 5 dias, aplicada sobre o enxerto cutâneo durante 15 dias. Avaliação macroscópica aos dias três, sete e 15 não demonstrou alteração com a aplicação de LBI sobre os enxertos. Avaliação histoquímica com picrosirius apresentou maior expressão de colágeno tipo I – vermelho em enxertos de G5 ( $p<0,05$ ), enquanto não houve expressão do mesmo em G1; a expressão de colágeno tipo III – verde não foi influenciada pela LBI. A avaliação histoquímica com hematoxilina-eosina evidenciou maior número de fibroblastos em enxertos de G4 ( $p<0,05$ ) e menor hemorragia em enxertos de G5 ( $p<0,05$ ). Houve modulação da resposta inflamatória em enxertos cutâneos irradiados, enquanto a LBI não teve efeito sobre a angiogênese. Conclui-se que a exposição de enxertos cutâneos à dose de energia de 6 J/cm<sup>2</sup> ou 10 J/cm<sup>2</sup> a cada 5 dias beneficiaram a cicatrização e a modulação da inflamação local.

**Palavras-Chave:** cicatrização, cirurgia reconstrutiva, inflamação, laserterapia de baixa intensidade.

**EVALUATION THE OF ANGIOGENESIS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN  
FREE SKIN GRAFTS SUBMITTED TO LASER THERAPY IN RATS  
(*Rattus novergicus albinus wistar*)**

**ABSTRACT** - The reconstructive techniques has been widely used in Veterinary Medicine. To reduce inherent complications to the reconstructive techniques, the postoperative adjuvants therapies are used, such as low-level laser therapy (LLLT). The aim of this work is to determine the low-level laser therapy's effects on the healing, inflammation and vascularization of the free skin grafts grafts in applicable time intervals to the veterinary surgery routine. Forty rats (*Rattus novergicus albinus wistar*) were used, and each one was submitted to the autogenous free skin graft on the interescapular region. They were allocated randomly in five groups (G1, G2, G3, G4 and G5) according to the 6 J/cm<sup>2</sup> or 10 J/cm<sup>2</sup> doses every 3 or 5 days for 15 days. The macroscopic evaluation on the third, seventh and fifteenth day did not show alterations of the LLLT on the grafts. The histochemical evaluation with picosirius had more expression of the type I collagenous – red in the grafts of G5 ( $p<0,05$ ), while in the G1 did not; the expression of the type III collagenous – green was not influenced by LPLT. The histochemical evaluation with hematoxylin-eosin showed more numbers of fibroblasts in the grafts of G4 ( $p<0,05$ ) and less hemorrhage in grafts of G5 ( $p<0,05$ ). It had modulation of the inflammatory response in the irradiated cutaneous grafts, while the LPLT had no effect on the angiogenesis. Then, it observed that the exposure of the cutaneous grafts to the 6 J/cm<sup>2</sup> or 10 J/cm<sup>2</sup> doses every 5 days improved the healing and the modulation of the local inflammation.

**Keywords:** healing, reconstructive surgery, inflammatory, low level laser therapy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

D3 – Dia 3 de pós-operatório

D7 – Dia 7 de pós-operatório

D15 – Dia 15 de pós-operatório

IM – via Intramuscular

IV – via Intravenosa

kg – quilograma

LBI – laserterapia de baixa intensidade

mg – miligrama

mL – mililitro



## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Distribuição dos animais em grupos conforme dose de laserterapia de baixa intensidade e intervalo de exposição durante os dias de pós-operatório. FCAV/UNESP, 2019.....11
- Quadro 2.** Anticorpos utilizados nas reações imunohistoquímicas em amostras de pele após 15 dias de realização de enxerto cutâneo submetidos à laserterapia de baixa intensidade. Laboratório de Imunohistoquímica FCAV/UNESP, 2019.....19
- Quadro 3.** Contagem de neutrófilos a partir de análise quantitativa em enxertos cutâneos e leitos doadores de acordo com grupo experimental com 15 dias de pós-operatório. Neutrófilos identificados de acordo com marcação histoquímica com hematoxilina-eosina. FCAV/UNESP, 2019.....25
- Quadro 4.** Contagem de vasos sanguíneos a partir de análise quantitativa de enxertos cutâneos e leitos doadores de acordo com grupo experimental, com 15 dias de pós-operatório. Vasos sanguíneos identificados de acordo com marcação histoquímica com hematoxilina-eosina. FCAV/UNESP, 2019.....25
- Quadro 5.** Média de macrófagos de acordo com cada grupo experimental de enxertos cutâneos em ratos, submetidos à laserterapia de baixa intensidade, tratados pelo período de 15 dias. Macrófagos marcados mediante imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal MAC387. FCAV/UNESP, 2019.....28
- Quadro 6.** Valores de média de CD31 de acordo com o grupo experimental de enxertos cutâneos em ratos, submetidos à laserterapia de baixa intensidade, tratados pelo período de 15 dias. CD31 marcado mediante imunohistoquímica pelo anticorpo policlonal CD31. FCAV/UNESP, 2019.....28
- Quadro 7.** Valores de média de COX-2 de acordo com o grupo experimental de enxertos cutâneos em ratos, submetidos à laserterapia de baixa intensidade, tratados por 15 dias. COX-2 marcado mediante imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal COX-2. FCAV/UNESP, 2019.....29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens fotográficas de confecção de leitos doador e receptor para enxertia cutânea. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Posicionamento em decúbito ventral após indução anestésica, seguida de tricotomia ampla em região dorsal. B) Demarcação de leito receptor com 3x3 cm em região interescapular e em leito doador de 2x2 cm em região lombar. C) Leito receptor (cranial) e leito doador (caudal) confeccionados após incisão de pele.....12
- Figura 2.** Imagens fotográficas de confecção de enxerto cutâneo em rato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Coleta de enxerto cutâneo em leito doador, incluindo epiderme e derme. Ramos terminais das artérias cutâneas diretas indicados por pinça anatômica. B) Enxerto cutâneo em sua totalidade. C) Vista ventral de enxerto cutâneo após remoção de tecido subcutâneo e fenestrado no sentido longitudinal. D) Vista dorsal de enxerto cutâneo em malha, pronto para aplicação em leito receptor.....13
- Figura 3.** Imagens fotográficas de suturas de enxerto cutâneo e leito doador em rato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Jaboticabal-SP, 2019. A) Enxerto cutâneo em malha sobre leito receptor em região interescapular, pontos iniciais de sutura com náilon 5.0 em padrão simples separado, realizados nas extremidades do enxerto (seta preta). Em leito doador em região lombar, realizada dermorrafia em padrão simples separado com náilon 5.0 em forma de figura geométrica, fazendo a união inicial de extremidades da ferida (asterisco preto). B) Enxerto cutâneo completamente suturado em leito receptor em pontos simples separados, sem tensão, em náilon 5.0 (seta preta). Leito doador suturado com náilon 5.0 em pontos simples separado em figura geométrica, sem tensão (asterisco preto).....14
- Figura 4.** Imagem fotográfica da bandagem compressiva sobre enxerto cutâneo em rato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. Bandagem compressiva sobre enxerto cutâneo utilizando gaze estéril e suturada em “tie over modificado”, em pós-operatório imediato.....15
- Figura 5.** Imagem fotográfica de laserterapia de baixa intensidade em ratos após procedimento cirúrgico reconstrutivo. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Distribuição ilustrativa dos pontos de irradiação nas margens e centro do enxerto cutâneo (círculos vermelhos). B) Irradiação de LBI em enxerto cutâneo em rato durante pós-operatório imediato. C) Irradiação de LBI em enxerto cutâneo em rato durante pós-operatório de 5 dias, ponteira em ângulo de 90° em contato com a pele.....16

- Figura 6.** Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução das feridas quanto à variável exsudato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo (G1) em D3, D7 e D15, respectivamente. B, E, H) Enxerto cutâneo de animal (G4) em D3, D7 e D15, respectivamente. C, F, I) Enxerto cutâneo de animal (G1) em D3, D7 e D15, respectivamente. Ao teste Tukey foi observada diferença estatística ( $p<0,05$ ) com relação à variável exsudato ao D7 em relação aos dias D3 e D15, independente do tratamento com LBI.....21
- Figura 7.** Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução da ferida quanto à variável coloração. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo de animal (G4) em D3, D7 e D15, respectivamente. B, E, H) Enxerto cutâneo de animal (G2) em D3, D7 e D15, respectivamente. C, F, I) Enxerto cutâneo de animal (G2) em D3, D7 e D15, respectivamente. Ao teste Tukey foi observada diferença estatística ( $p<0,05$ ) com relação à variável coloração entre as médias de D7 e D15, e entre D3 e D15, independente do tratamento com LBI.....22
- Figura 8.** Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução da ferida de acordo com o aspecto cosmético. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo de animal (G5) em D3, D7 e D15, respectivamente. B, E, H) Enxerto cutâneo de animal (G4) em D3, D7 e D15, respectivamente. C, F, I) Enxerto cutâneo de animal (G3) em D3, D7 e D15, respectivamente. Ao teste Tukey foi observada diferença estatística ( $p<0,05$ ) em D7 e D15.....23
- Figura 9.** Representação gráfica da análise quantitativa de fibroblastos em enxertos cutâneos e leito doador, mediante análise de variância (ANOVA). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, 2019. A) Diferença estatística ( $p<0,05$ ) em G4 em relação a contagem de fibroblastos em enxertos cutâneos, quando comparado aos demais grupos, assim como em leito doador do mesmo grupo.....24
- Figura 10.** Representação gráfica de teste não paramétrico aplicado sobre presença de necrose em enxertos cutâneos e leitos doadores de acordo com cada grupo de tratamento, aos 15 dias de pós-operatório. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, 2019. A) Diferença estatística ( $p<0,05$ ) de enxertos cutâneos em G3 ao apresentar maior média de necrose em relação aos leitos dos demais grupos. B) Seguida da média de necrose em enxertos cutâneos em G2 com diferença estatística ( $p<0,05$ ). C) Os valores mensurados para enxertos cutâneos em G1, G4, G5 e leitos doadores em G2 apresentam mesma média, com diferença significativa ( $p<0,05$ ). D) Os valores mensurados para leitos doadores em G1, G3, G4 e G5 apresentam menor necrose com valores significativos ( $p<0,05$ ).....26

**Figura 11.** Representação gráfica da análise quantitativa da presença de hemorragia em enxertos cutâneos em grupos experimentais, aos 15 dias de pós-operatório. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Enxertos cutâneos em G3 e G1 apresentaram maior quantidade de hemorragia com diferença estatística ( $p<0,05$ ) em relação aos enxertos em G2 e G4. B) Presença de hemorragia mensurada nos enxertos cutâneos em G2 e G4 apresentaram diferença significativa ( $p<0,05$ ) sobre enxertos de G5. C) Hemorragia mensurada em enxertos cutâneos em G5.....27

**Figura 12.** Representação gráfica em colunas da média de expressão de colágeno tipo I – vermelho em leito doador e enxerto cutâneo nos grupos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, 2019. A) Diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre leito doador e enxerto cutâneo em G1. B) Diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre leito doador e enxerto cutâneo em G5.....30

**Figura 13.** Representação gráfica em colunas da média de expressão de colágeno tipo III – verde em leito doador e enxerto cutâneo nos grupos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, 2019. A) Diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre leito doador e enxerto cutâneo em G1. B) Diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre leito doador e enxerto cutâneo em G4.....31

## 1. INTRODUÇÃO

A cirurgia reconstrutiva vem ganhando importância nas últimas décadas devido ao manejo de feridas traumáticas e exérese de neoplasmas, com objetivo de promover cicatrização e retorno funcional do tecido lesado próximo a normalidade (Castro et al., 2015). Ao se empregar técnicas reconstrutivas, objetiva-se adequada cobertura da ferida e redução do tempo de cicatrização (Amsellen, 2011; Martins et al., 2015).

Os retalhos e enxertos cutâneos são exemplos de técnicas aplicadas em cirurgias reconstrutivas (Szentimrey, 1998; Montinaro et al., 2014). Os retalhos cutâneos são porções de pele, incluindo epiderme e derme, removidos parcialmente de seu leito original e transferidos para outro local próximo, mantendo a base (Andreassi et al., 2005). Os enxertos cutâneos são segmentos de epiderme e derme completamente removidos do leito doador e transferidos para o leito receptor distante (Stanley et al., 2013).

Diversas complicações são relatadas em cirurgias reconstrutivas, como inflamação, edema e seroma (Amsellen, 2011). Terapias adjuvantes como a laserterapia de baixa intensidade (Cury et al., 2009), Células-tronco (Gómez, 2016) e plasma rico em plaquetas (Pazzini et al., 2016), entre outras técnicas têm sido estudadas nos últimos anos com o objetivo de reduzir as complicações inerentes à reconstrução.

A laserterapia de baixa intensidade tem sido aplicada à Medicina Veterinária devido à capacidade de promover alterações físicas e biológicas. Desse modo, estas alterações metabólicas podem ajudar na redução do processo inflamatório, promoção da circulação sanguínea, concomitantemente atuando no processo de cicatrização (Busnardo e Simões, 2010).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar os efeitos da laserterapia de baixa intensidade em enxertos cutâneos em ratos, submetidos às doses de 6 J/cm<sup>2</sup> e 10J/cm<sup>2</sup>, em intervalos de 3 e 5 dias. Além disso, avaliou-se a angiogênese, inflamação e cicatrização após 15 dias de tratamento, por meio de marcadores histoquímicos, como hematoxilina-eosina e Picrosirius, e marcadores imuno-histoquímicos como COX-2, CD31 e Macrófagos.

## 7. CONCLUSÃO

Diante do exposto é possível concluir que a irradiação de laserterapia de baixa intensidade, utilizando comprimento de onda de 660 nm, 30 mW, nas doses de 6 J/cm<sup>2</sup> ou 10 J/cm<sup>2</sup> a cada 5 dias, beneficiaram o processo de reparação, bem como na expressão de colágeno tipo I – vermelho em 15 dias de tratamento, assim como modulação da resposta inflamatória em enxertos cutâneos em ratos.

## 8. REFERÊNCIAS<sup>11</sup>

Almeida JM, Moraes RO, Gusman DJR, Faleiros PL, Nagata MJH, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF (2017) Influence of low-level laser therapy on the healing process of autogenous bone block grafts in the jaws of systemically nicotine-modified rats: a histomorphometric study. **Archives of Oral Biology** 75: 21-30.

Alves LM, Corrêa JB, Liebano RE (2009) Agêdes físicos na integração de enxertos de pele. **Revista de Ciências Médicas** 18:201-208.

Amâncio ACG, Barbieri CH, Mazzer N, Garcia SB, Thomazini JA (2006) Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica** 14:276-9.

Amsellen P (2011) Complications of reconstructive surgery in companion animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 41: 995-1006.

Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML (2014) Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia** 41: 129-133.

Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C (2005) Classification and pathophysiology of skin grafts. **Clinics in Dermatology** 23: 332-337.

---

11 - De acordo com Normas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, 2018.  
<http://www.fcav.unesp.br/#/pos-graduacao/programas-pg/cirurgia-veterinaria/normas-e-diretrizes/>

Audrain H, Bray A, De Berker D (2015) Full-thickness skin grafts for lower leg defects: na effective repair option. **Dermatol Surgery** 41:493-498.

Bedoya SAO, Conceição LG, Vilorio MIV, Loures FH, Valenta FL, Amorim RL, Silva FF (2016) Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 68: 147-154.

Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MCD, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LRS, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA (2016) Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and Technique** 79: 313-320.

Busnardo VL, Biondo-Simões MLPB (2010) Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 14: 45-51.

Carvalho PTC, Silva IS, Reis FA, Pereira DM, Aydos RD (2010) Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** 25:71-9.

Castro JLC, Huppes RR, De Nardi AB, Pazzini JM (2015) Introdução à anatomia. In.: Castro, JLC, Huppes, RR, De Nardi, AB, Pazzini, JM (Eds.) **Princípios e técnicas de cirurgias reconstrutivas da pele de cães e gatos (atlas colorido)**. Curitiba: Medvep, p.10-16.

Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M (2014) Effects of low-power light therapy on wound healing: Laser X Led. **Anais Brasileiros de Bras DDermatologia** 89: 616-623.

Cury V, Bossini PS, Fangel R, Crusca JS, Renno AC, Parizotto NA (2009) The effects of 660nm and 780nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. **Photomedicine and Laser Surgery** 27: 721-724.

Cury V, Moretti AIS, Assis L, Bossini, Crusca JS, Benatti Neto C, Fangel R, Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA (2013) Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 $\alpha$  and MMP-2. **Journal of Photochemistry and Photobiology** 125: 164-170.

Dahmardehei M, Kazemikhoo N, Vaghardoost R, Mokmeli S, Momeni M, Nilforoushzadeh MA, Ansari F, Amirkhani A (2016) Effects of low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. **Lasers in Medical Science** 31:497-502.

Diwan MF, Abid TA (2016) The effect of different doses of 660nm laser therapy on open skin wound healing in Wistar rats. **Kufa Journal of Veterinary Medical Sciences** 7: 130-137.

Dyson M (2006) Primary, secondary and tertiary effects of phototherapy: a review. **Proceedings of Society of Photo-optical Instrumentation Engineers** 6140: 1-12.

Esteves Júnior I, Masson IB, Oshima CTF, Paiotti APR, Liebano RE, Plaper H (2012) Low-level laser irradiation, cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and necrosis of random skin flaps in rats. **Lasers in Medical Science** 27: 655-660.

Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R (2014) Biological effects of low level laser therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences** 5: 58-62.

Felice TD et al. (2009) Utilização do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Interbio** 3: 42-52.

Fiório FB, Albertini R, Leal-Júnior ECP, Carvalho PTC (2013) Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science** 29: 313-319.

Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade ZA, Reis SRA, Medrado ARAP (2017) Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. **Internacional Wound Journal** 15:274-282.

Gagnon D, Gibson TWG, Singh A, Linden AR, Kazienko JE, LaMarre J (2016) Na *in vitro* method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. **BMC Veterinary Research** 12:1-10.

Garcia VG, Macarini VC, Almeida JM, Bosco AF, Nagata MJ, Okamoto T, Longo M, Theodoro LH (2012) Influence of low-level laser therapy on wound healing in nicotine-treated animals. **Lasers in Medical Science** 27:437-43.



Gómez JLA (2016) **Auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não do uso de células tronco mesenquimais xenógenas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. 54f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – UNESP, Jaboticabal.

Goto H, Yoshikawa S, Mori K, Otsuka M, Omodaka T, Yoshimi K, Yoshida Y, Yamamoto O, Kiyohara Y (2017) Retrospective evaluation of factors influencing successful skin grafting for patients with skin cancer of the foot. **The Journal of Dermatology** 44:1043-45.

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

Inoe AP, Zafaneli CCG, Rossato RM, Leme MC, Sanches AWD, Araújo CV, Araújo SI (2008) Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência HeNe em feridas cutâneas de coelhos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 11: 27-30.

Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC (2010) Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med** 89: 125-131.

Kazemikhoo N et al. (2018) Evaluation of the effects of low level laser therapy on the healing process after skin graft surgery in burned patients (a randomized clinical trial). **Journal of Lasers in Medical Sciences** 9: 139-143.

Kitamura S, Yanagi T, Takashima Y, Imafuku K, Hata H (2018) Dermoscopic evaluation for skin grafts after surgery; neo-vascularization correlates with survival of skin grafts: a prospective study. **Journal of Dermatological Science** 90: 213-216.

Loreti EH, Pascoal VLW, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF (2015) Use of laser therapy in the healing process: a literature review. **Photomedicine and Laser Surgery** 33: 104-116.

Martins MIM, Elias BC, Justino RC, Hilst CLS (2015) Cirurgia reconstrutiva com retalho cutâneo de avanço como técnica alternativa para tratamento de carcinoma de células escamosas em cães: relato de caso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** 22: 131-136.

Masseno APB, Porto CD, Nunes LC, Sequeira JL, Alvarenga (2010) Miofibroblastos: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia** 17: 177-190.

Mathur RK, Sahu K, Saraf S, Patheja P, Khan F, Gupta PK (2016) Low-level laser therapy as na adjunct to conventional therapy in the treatment of diabetic foot ulcers. **Lasers in Medical Science** 32- 275-282.

Medeiros ML, Araújo Filho I, Silva EMN, Queiroz WSS, Soares CD, Carvalho MGF, Maciel MAM (2017) Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. **Lasers in Medical Science** 32: 35-43.

Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA (2003) Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine** 32:293-244.

Miller AJ, Cashmore RG, Marchevsky AM, Havlicek M, Brown PM, Fearnside SM (2016) Negative pressure wound therapy using a portable single-use device for free skin grafts on the distal extremity in seven dogs. **Australian Veterinary Journal** 94: 309- 3016.

Montinaro V (2014) Lateral caudal axial pattern flap in 13 dogs. **Veterinary Surgery** 9999: 1-6.

Núñez SC, França CM, Silva DFT, Nogueira GEC, Prates RA, Ribeiro MS (2012) The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science** 28: 633-641.

Paim CBV, Raiser AG, Cardoso E, Beck C (2002) Enxerto autólogo de pele em malha de espessura completa, na reparação de feridas carpometacarpianas de cães - Resposta à irradiação laser AsGa. **Ciência Rural** 32: 451-457.

Pavletic MM (2010) Free grafts. In.: **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. Iowa: Wiley-Blackwell, p.403-432.

Pazzini JM, De Nardi AB, Huppes RR, Gering AP, Ferreira MGPA, Silveira CPB, Luzzi MC, Oliveira JAÁ (2016) Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 36: 108-118.

Pazzini JM, Moraes PC (2015) Princípios e técnicas para realização de enxertos cutâneos. In.: **Princípios e técnicas de cirurgias reconstrutivas da pele de cães e gatos (atlas colorido)**. Curitiba: Medvep, p.95-102.

Pinto MVM, Tavares RV (2011) Laserterapia suas peculiaridades clínicas e fotobiológicas. In.: **Fototerapia aspectos clínicos da reabilitação**. São Paulo: Andreoli, p.181-206.

Ramos FS, Maifrino LBM, Alves S, Alves BCA, Perez MM, Feder D, Azzalis LA, Junqueira VBC, Fonseca FLA (2018) The effects of transcutaneous low-level laser therapy on the skin healing process: an experimental model. **Lasers in Medical Science** 33: 967-976.

Renno ACM, Iwama AM, Shima P, Fernandes KR, Carvalho JG, Oliveira P, Ribeiro DA (2011) Effect of low-level laser therapy (660nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy** 13: 237-242.

Riggs J, Jennings JLF, 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.

Saifzadeh S, Hobbenaghi R, Noorabadi M (2005) Axial pattern flap based on the lateral caudal arteries of the tail in the dog: an experimental study. **Veterinary Surgery** 34: 509-513.

Samaneh R, Ali Y, Mostafa J, Mahmud NA, Zohre R (2015) Laser therapy for wound healing: a review of current techniques and mechanisms of action. **Biosciences Biotechnology Research Asia** 12: 217-223.

Serra et al. (2016) Skin grafting for the treatment of chronic leg ulcers – a systematic review in evidence-based medicine. **Internacional Wound Journal** 14: 149-157.

Silva AA, Leal-Júnior ECP, Alves ACA, Rambo CS, Santos AS, Vieira RP, Carvalho PTC (2013) Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy** 15:210-16.

Silva IHM, Andrade SC, Faria ABS, Fonsêca DDD, Gueiros LAM, Carvalho AAT, Silva WTF, Castro RM, Leão JC (2016) Increase in the nitric oxide release without changes in cell viability of macrophages after laser therapy with 660 and 808nm lasers. **Lasers in Medical Science** 31: 1855-1862.

Silva TS, Mendes F, Alves AMP, Alves EPB, Bertolini GRF (2010) Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência. **Revista Brasileira de Biociências** 8: 264-267.

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.

Swain SF (2007) Enxertos cutâneos. In.: **Manual de cirurgia de pequenos animais**. Barueri: Manole, p.321-338.

Szentimrey D (1998) Principles of reconstructive surgery for the tumor patient. **Clinical Techniques in Small Practice** 13: 70-76.

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.

## **APÊNDICE**

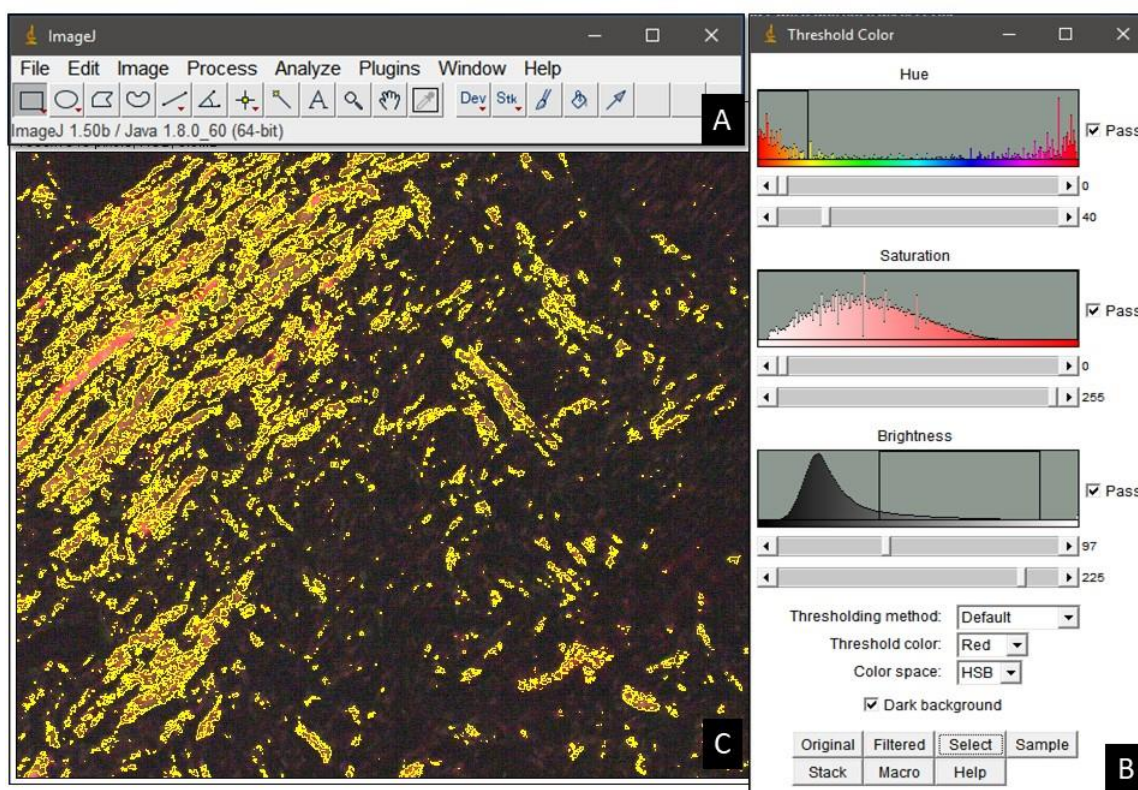
## APÊNDICE A

Método de avaliação das variáveis macroscópicas após enxertia cutânea em ratos.  
FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal

| Rato:                    | Dia Pós-Operatório:                                                         |                                                                                    | Data Avaliação:                                                                          |                                                                |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Cirurgia:                | Grupo:                                                                      |                                                                                    | Avaliador:                                                                               |                                                                |
| <b>EXSUDATO</b>          | 0 – Ausente                                                                 | 1 – Discreto                                                                       | 2 – Moderado                                                                             | 3 – Intenso                                                    |
| %                        | Localização                                                                 |                                                                                    |                                                                                          |                                                                |
| <b>COLORAÇÃO</b>         | 0 – Pálida                                                                  | 1 – rósea                                                                          | 2 – Hiperêmica                                                                           | 3 – Cianótica                                                  |
| %                        | %                                                                           | %                                                                                  | %                                                                                        | %                                                              |
| <b>EDEMA</b>             | 0 – Ausente                                                                 | 1 – Discreto                                                                       | 2 – Moderado                                                                             | 3 – Intenso                                                    |
| %                        | Localização                                                                 |                                                                                    |                                                                                          |                                                                |
| <b>ASPECTO COSMÉTICO</b> | 0 – Excelente                                                               | 1 – Bom                                                                            | 2 – Regular                                                                              | 3 – Ruim                                                       |
| %                        | Localização                                                                 |                                                                                    |                                                                                          |                                                                |
| Variável                 | Graduação                                                                   |                                                                                    |                                                                                          |                                                                |
|                          | 0                                                                           | 1                                                                                  | 2                                                                                        | 3                                                              |
| <b>Exsudato</b>          | <b>Ausente</b><br>(nenhuma secreção na ferida cirúrgica)                    | <b>Discreto</b><br>(secreção ao redor da ferida cirúrgica)                         | <b>Moderado</b><br>(aproximadamente 50% da ferida cirúrgica apresenta secreção)          | <b>Intenso</b><br>(toda a ferida cirúrgica apresenta secreção) |
| <b>Coloração</b>         | <b>Pálida</b> (70% do enxerto apresenta coloração esbranquiçada)            | <b>Rósea</b> (70% do enxerto apresenta coloração semelhante ao tecido íntegro)     | <b>Hiperêmica</b> (70% do enxerto apresenta-se vermelho intenso semelhante à inflamação) | <b>Cianótica</b> (70% do enxerto apresenta coloração escura)   |
| <b>Edema</b>             | <b>Ausente</b><br>(nenhuma tumefação do tecido adjacente à área do enxerto) | <b>Discreto</b><br>(presença de tumefação pontual proveniente de líq intersticial) | <b>Moderada</b> (50% do enxerto apresenta áreas de tumefação)                            | <b>Intenso</b><br>(tumefação por toda a extensão do enxerto)   |

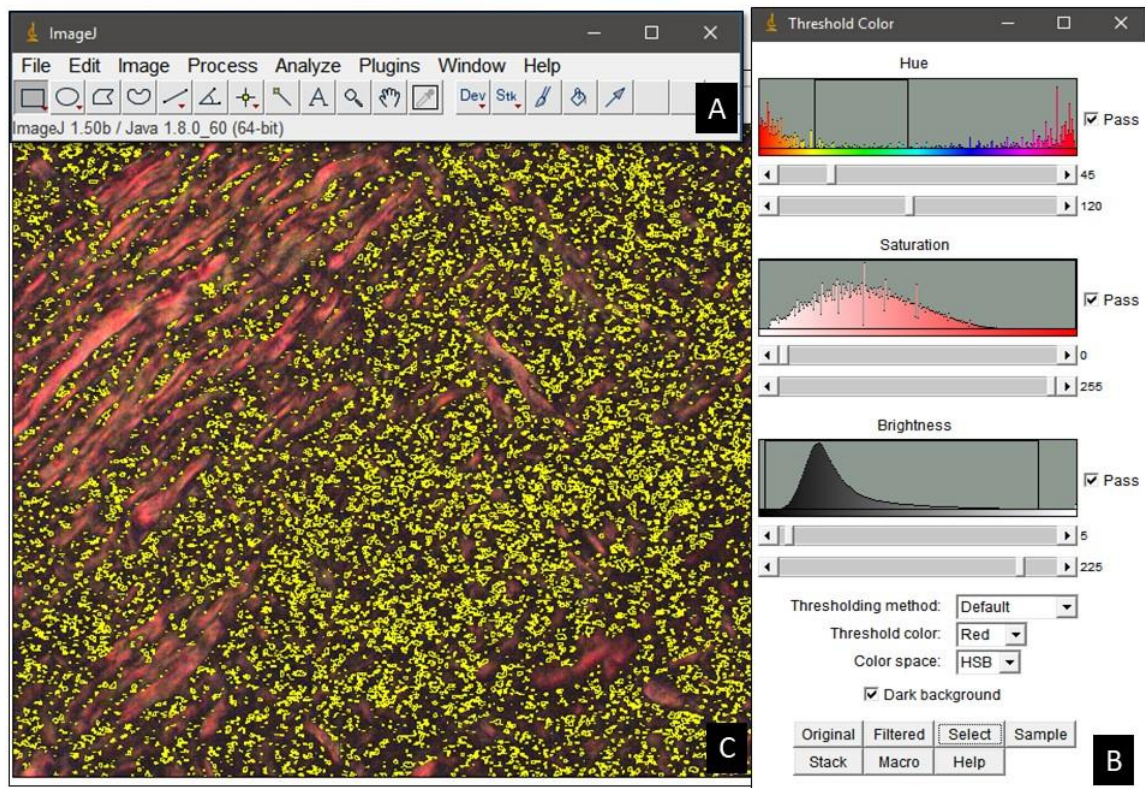
(Adaptado de Paim et al., 2002)

## APÊNDICE B



Esquema ilustrativo da metodologia de análise do Picrosirius utilizando o software ImageJ®. A) Interface do software ImageJ®. B) Interface do plug-in Thereshold Colour, aplicando a matiz (*Hue*) entre 0-40, saturação (*Saturation*) de 0-255 e brilho (*Brightness*) de 5 a 225 para identificação de colágeno tipo I vermelho. C) Identificação de áreas de colágeno tipo I vermelho, contornadas em amarelo.

## APÊNDICE C



Esquema ilustrativo da metodologia de análise do Picrosirius utilizando o software ImageJ®. A) Interface do software ImageJ ®. B) Interface do plug-in Thereshold Colour, aplicando a matiz (*Hue*) entre 45-120, saturação (*Saturation*) de 0-255 e brilho (*Brightness*) de 5 a 225 para identificação de colágeno tipo III verde. C) Identificação de áreas de colágeno tipo III verde, contornadas em amarelo