

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

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 novergicus albinus wistar)

Discente: Stella Habib Moreira

Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi

Coorientador (a): Dr. Rafael Ricardo Huppes

Coorientador (a): Dra. Josiane Morais 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 Moreira, Stella Habib
 Avaliação da angiogênese e resposta inflamatória em enxertos cutâneos... / Stella Habib Moreira. -- Jaboticabal, 2019
 64 p. : tabs., fotos

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
 Orientador: Andriago Barboza De Nardi
 Coorientadora: Josiane Morais Pazzini

 1. Cirurgia. 2. Lasers. 3. Cirurgia plástica. 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).

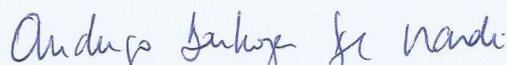
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA 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
COORIENTADOR: RAFAEL RICARDO HUPPES
COORIENTADORA: JOSIANE MORAIS PAZZINI

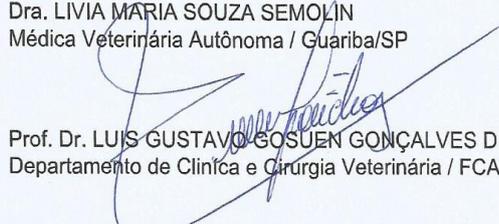
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



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 GOSUEN 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 Andriago Barboza De Nardi e coorientação da Doutora Josiane Morais 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 Andriago 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
SUMÁRIO	i
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Enxertos Cutâneos	02
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
2.2. Laserterapia	05
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
3. OBJETIVOS	09
4. MATERIAL E MÉTODOS	09
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
5. RESULTADOS	20
5.1. Avaliação macroscópica	20
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

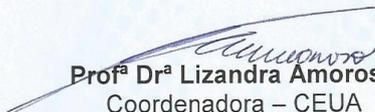
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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. 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 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.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ENXERTOS CUTÂNEOS SUBMETIDOS À LASERTERAPIA EM RATOS
(*Rattus novergicus 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 novergicus 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/cm² ou 10 J/cm² 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 picrosírius 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/cm² ou 10 J/cm² 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 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/cm² or 10 J/cm² 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/cm² or 10 J/cm² 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 – kilograma

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 dermorráfia 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/cm² e 10J/cm², 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enxertos cutâneos

Enxerto cutâneo corresponde a segmento da epiderme e derme completamente removido do leito doador e transferido para leito receptor distante (Stanley et al., 2013). Esta técnica é aplicada quando há perda cutânea significativa e a correção cirúrgica convencional não promove a síntese completa da lesão, bem como na intenção de se obter efeito cosmético favorável (Stanley et al., 2013; Pazzini e Moraes, 2015).

2.1.1. Classificação e origem dos enxertos cutâneos

Os enxertos cutâneos são classificados de acordo com a sua espessura em completo e parcial (Kitamura et al., 2017). Os modelos de espessura completa possuem em sua constituição epiderme e derme, suportando maior manipulação durante sua obtenção (Audrain et al., 2015). Logo, os enxertos de espessura parcial possuem em sua constituição epiderme e porção variável de derme, sendo coletado com o auxílio de dermatomo, apresentando baixas taxas de complicações na literatura (Riggs et al., 2015).

Os modelos de espessura parcial são subclassificados em espessura fina, média ou espessa, de acordo com Serra et al. (2016). São aplicados em áreas de grande perda cutânea, onde o leito receptor é pouco vascularizado e não há possibilidade de aplicação de retalhos cutâneos, como extremidade de membros (Andreassi et al., 2005).

Além disso, os enxertos cutâneos também são classificados quanto a sua origem. Os autoenxertos são aqueles em que o doador e o receptor são o mesmo indivíduo, enquanto os isoenxertos são obtidos de doador da mesma espécie, porém geneticamente próximos. Os aloenxertos são obtidos de doador da mesma espécie, porém geneticamente diferentes. Os xenoenxertos são obtidos de espécies diferentes (Andreassi et al., 2005; Swain, 2007).

Os enxertos são classificados também quanto ao seu modelo, sendo divididos em camada, malha e sementeira. Em camada, consiste em modelo aplicado na sua forma íntegra, obtendo epiderme e derme, retira-se o tecido subcutâneo e posteriormente é acomodado no leito receptor. O modelo em malha segue os princípios de coleta e confecção semelhantes ao em camada, diferindo da presença de janelas longitudinais ao longo da sua extensão. O modelo em sementeira, consiste em “ilhas” coletadas do leito doador por meio de “punch” de biópsia ou lâmina de bisturi, e são acomodados no leito receptor em pequenos orifícios, também confeccionados com “punch” (Pavletic, 2010; Pazzini e Moraes, 2015).

2.1.2. Confeção do enxerto cutâneo

A confecção do enxerto cutâneo requer manipulação cuidadosa, com o intuito de evitar complicações em drenagem vascular e linfática local. Sua coleta é feita a partir do leito doador, de acordo com as dimensões necessárias, conforme descrito por Tong e Simpson (2012). Região de flanco e lateral de tórax são consideradas de eleição para coleta do enxerto, entretanto deve-se considerar a espessura da pele entre leito doador e leito receptor (Pazzini e Moraes, 2015).

O local doador deve apresentar pelos da mesma coloração que o leito receptor, assim como, textura e comprimento, a fim de reduzir suas diferenças quando implantado (Andreassi et al., 2005; Miller et al., 2016). O local doador após a retirada do enxerto apresentará lesão de continuidade, a qual deve ser reduzida com sutura sem tensão, sendo necessário em alguns casos a aplicação de técnicas reconstrutivas (Montinaro et al., 2014; Miller et al., 2016).

Para a aplicação do enxerto no leito receptor, este deve apresentar tecido de granulação limpo, não hipertrofiado e livre de contaminação (Andreassi et al., 2005; Saifzadeh et al., 2005). É sabido que leito receptor com escassa vascularização pode ser um fator limitador na aplicação do enxerto cutâneo, principalmente em extremidade distal de membro, onde se tem dificuldade em aplicar retalhos cutâneos (Audrain et al., 2015). Todavia, grande parte dos enxertos cutâneos sobrevive nesses leitos, mesmo com pouca vascularização (Amsellem, 2011).

2.1.3. Fases de cicatrização do enxerto cutâneo

A cicatrização do enxerto é constituída pelas fases de aderência, embebição plasmática, inosculação e revascularização, tardiamente ocorrendo a fase de contração (Stanley et al., 2013). Logo após sua aplicação no leito receptor, uma rede de fibrina faz a adesão do enxerto ao leito, sendo a fase de aderência. Os filamentos de fibrina sofrem retração, tracionando o enxerto até que ocorra a aposição com o leito receptor (Andreassi et al., 2005). Fibroblastos, leucócitos e macrófagos invadem a rede de fibrina entre o enxerto e o leito receptor promovendo ganho progressivo de resistência. A rede de fibrina é substituída por tecido fibroso por volta do décimo dia. Com o passar do tempo o colágeno sofre maturação, responsável pela retração do enxerto (Swain, 2007; Pazzini e Moraes, 2015).

A embebição plasmática acontece 24 horas após o procedimento cirúrgico, ocorrendo transudação do soro oriundo dos vasos seccionados da área receptora, contendo eritrócitos e leucócitos, sendo absorvido pelo enxerto (Andreassi et al., 2005; Swain, 2007). A fase de inosculação é caracterizada pela anastomose de pequenos capilares, comunicando a superfície do enxerto e o leito receptor, ocorrendo de 48 a 72 horas após o procedimento cirúrgico (Stanley et al., 2013; Pazzini e Moraes, 2015).

Brotos vasculares provenientes do leito receptor se desenvolvem, comunicando-se com as extremidades seccionadas dos vasos do enxerto, promovendo a angiogênese local (Riggs et al., 2015). Durante a fase de revascularização o enxerto se encontra frágil, entretanto com a angiogênese, novos vasos sanguíneos são responsáveis pelo fluxo verdadeiro, aproximadamente cinco a sete dias do procedimento cirúrgico, ocorre a nutrição e oxigenação de forma adequada do enxerto (Pavletic, 2010). Além da formação de vasos sanguíneos, ocorre a formação de vasos linfáticos, promovendo a drenagem linfática (Swain, 2007; Stanley et al., 2013).

O processo de angiogênese ocorre na fase de revascularização, sendo os vasos sanguíneos recém-formados tortuosos e com dilatação irregular (Cury et al., 2013). A maturação dos vasos inicia dentro de 48 horas com a formação de novos capilares indiferenciados, esse processo terá continuidade até o desenvolvimento de novo sistema de arteríolas, vênulas e capilares (Swain, 2007; Riggs et al., 2015). Caso

não ocorra reestabelecimento da drenagem venosa e linfática, ou ocorra de forma deficiente, há formação de edema, predispondo complicações, bem como perda do enxerto (Amsellen, 2011; Pazzini e Moraes, 2015).

A fase de contração ocorre de modo tardio, podendo estender por até 6 meses. É caracterizada pela ação dos miofibroblastos e proteínas contráteis, promovendo a contração do enxerto no leito receptor (Isaac et al., 2010). Os miofibroblastos participam da síntese da matriz extracelular e na força mecânica, influenciando na organização do colágeno e na contração da ferida (Masseno et al., 2010).

2.1.4. Cuidados pós-operatórios

Com o objetivo de promover maior contato entre enxerto cutâneo e leito receptor, recomenda-se a aplicação de bandagem compressiva (Andreassi et al., 2005). A bandagem compressiva reduz a mobilidade, assim como beneficia a fase de aderência (Stanley et al., 2013; Miller et al., 2016). De acordo com o local de aplicação do enxerto cutâneo e seu tamanho, pode-se utilizar bandagem compressiva elástica, esponja ou gaze fixada com suturas (Andreassi et al., 2005).

As principais complicações decorrentes do uso de enxertos cutâneos são necrose, inflamação e seroma. O acúmulo de líquido entre o enxerto e o leito receptor e infecção são causas comuns de falhas na técnica e insucesso do procedimento (Amsellen, 2011; Riggs et al., 2015).

O processo de cicatrização é mediado por fatores de crescimento, desse modo a utilização de técnicas alternativas que propiciem os passos da cicatrização pode beneficiar a enxertia cutânea (Issac et al., 2010; Kazemikhoo et al., 2018). Por exemplo, o uso de laser de baixa intensidade em feridas cutâneas tem demonstrado benefícios na cicatrização, angiogênese e redução da inflamação através da liberação de citocinas pelas células (Felice et al., 2009).

2.2. Laserterapia

A sigla “laser” possui sua origem na língua inglesa – “light amplification by stimulated emission of radiation” (Ramos et al., 2018). Sendo definida como fonte de

luz monocromática, com comprimento de onda único; coerente, aonde todas as ondas se encontram em mesma fase e colimada ao ser transmitida em única direção, sem divergências (Inoe et al., 2008; Andrade et al., 2014).

A utilização da laserterapia na área da saúde como instrumento terapêutico iniciou na década de 1960, entretanto, apesar de inúmeras pesquisas, existem controvérsias quanto à técnica de aplicação, dose utilizada e tempo de exposição (Busnardo e Simões, 2010).

Os aparelhos de laser consistem em cavidade óptica ressonante com diferentes tipos de meios ativos, como materiais sólidos, líquidos ou gasosos, produzindo luz por meio da passagem de corrente elétrica (Chaves et al., 2014).

2.2.1. Laserterapia de baixa intensidade

O laser é classificado quanto a sua potência ou intensidade de emissão, estando diretamente correlacionado com o efeito tecidual que se deseja produzir (Ramos et al., 2018). Laser de alta potência é aplicado em corte e coagulação de tecidos, enquanto laser de baixa potência é utilizado em processos de reparo tecidual, como traumatismos musculares, articulares, nervosos, ósseos e cutâneos, causando baixa ou imperceptível mudança na temperatura no local irradiado (Felice et al., 2009; Gagnon et al., 2016).

O laser de baixa intensidade (LBI) é caracterizado pelo potencial de alcance entre 10^{-3} a 10^{-1} W, comprimento de onda entre 300 a 10600 nm, pulso de 0 a 5000 Hertz, intensidade entre 10^{-2} a 10^0 W/cm e dose de 10^{-2} a 10^2 J/cm² (Chaves et al., 2014; Samaneh et al., 2015). Os meios ativos mais comuns são HeNe, AlGaAs, AsGa e AlGaInP (Farivar et al., 2014; Loreti et al., 2015).

A LBI é capaz de influenciar o comportamento celular por meio da fotobiomodulação, ou seja, capacidade dos tecidos absorverem a luz laser, estimulando ou inibindo o metabolismo celular (Renno et al., 2011; Silva et al., 2016). Atualmente a aplicação de laserterapia de baixa potência ou baixa intensidade tem sido estudada como terapia adjuvante no tratamento de feridas, por acelerar o processo cicatricial e modular inflamação (Samaneh et al., 2015; Ramos et al., 2018).

A interação da luz com o tecido depende de características como comprimento de onda da luz, dose aplicada e tecido (Chaves et al., 2014). Em estudo realizado por Loreti et al. (2015) as dosagens utilizadas variaram entre 0,03 a 117J/cm² com resultados positivos no processo de cicatrização de feridas, não havendo dose pré-determinada, cujo comprimento de onda variou entre 600 a 1000nm (Andrade et al., 2014).

Sendo o laser uma fonte de luz monocromática, coerente e colimada é possível que penetre a pele de forma não-invasiva (Samaneh et al., 2015). Estudos *in vivo* e *in vitro* sobre cicatrização de feridas, demonstram que a irradiação a laser acelerou a atividade de fibroblastos, o metabolismo do colágeno, assim como modulação de analgesia local e efeito anti-inflamatório (Loreti et al., 2015).

2.2.2. Mecanismo de ação

A LBI promove efeitos moleculares como ativação da enzima ATPase (estímulo à mitose e ao influxo de cálcio), aumento de mRNA (síntese proteica e proliferação celular), maior expressão de VEGF (“vascular endotelial growth factor”) e angiogênese (Cury et al., 2013; Kazemikhoo et al., 2018). Entretanto seu mecanismo de ação não é bem elucidado (Cury et al., 2013).

Os efeitos biológicos da laserterapia são classificados em primários, secundários e terciários. A reação primária é considerada uma interação entre fótons e fotorreceptores, dependendo do comprimento de onda aplicado. Após a absorção de energia, citocromo c oxidase inicia um estado excitatório, alterando a transferência de elétrons dentro da cadeia respiratória (Dyson 2006; Samaneh et al., 2015).

As reações secundárias não são dependentes apenas da absorção de energia do laser, mas relacionadas com a sensibilização celular, ocorrendo algumas horas até dias após a irradiação. Diversos efeitos metabólicos ocorrem, conduzindo mudanças fisiológicas em nível celular, como liberação de cálcio pela mitocôndria para o citoplasma. O cálcio disperso no citoplasma promove eventos relacionados com a migração celular, síntese de RNA e DNA, mitoses, síntese proteica e proliferação celular (Dyson, 2006; Farivar et al., 2014; Samaneh et al., 2015)

Os efeitos terciários são influenciados pelo ambiente interno, externo e interações intracelulares, sendo reações menos previsíveis, os quais atingem a mitocôndria e a membrana celular dos fibroblastos, queratinócitos ou células endoteliais, sendo absorvidos pelos cromóforos. São promovidas alterações na permeabilidade da membrana celular, melhoria na sinalização entre mitocôndrias, núcleo e citosol, formação de óxido nítrico e aumento do metabolismo oxidativo para a produção de ATP (adenosina trifosfato) (Felice et al., 2009; Pinto e Tavares, 2011). Com o aumento dos níveis de citocinas e fatores de crescimento as células irradiadas estabelecem comunicação intercelular com as células que não foram irradiadas (Dyson, 2006).

2.2.3. Efeitos da laserterapia de baixa intensidade

Os efeitos promovidos pela laserterapia de baixa intensidade permitem modulação da inflamação promovidos pela liberação de opioides endógenos, redução de prostaglandinas (PGE-2) e de ciclooxygenase – 2 (COX-2) (Silva et al., 2016). Além disso, possui efeito modulador sobre a resposta inflamatória por inibição da diferenciação de leucócitos, exsudação de células e plasma, assim como redução na secreção de interleucina 6, MCP-1, interleucina-10, TNF- α e interleucina -1 β (Hawkins e Abrahamse, 2005; Silva et al., 2016). Os linfócitos sofrem estímulo de proliferação, assim como os macrófagos são estimulados a aumentarem a fagocitose (Andrade et al., 2014).

A aplicação de laser em feridas tem como objetivo a redução do tempo de cicatrização (Núñez et al., 2012). Em estudos utilizando a irradiação de LBI em feridas foi possível observar o aumento das fibras colágenas, assim como seu remodelamento (Cury et al., 2013; Fiório et al., 2013; Mathur et al., 2016). O laser contribui para elevar a motilidade de células epiteliais, promove a formação quantitativa e qualitativa de tecido de granulação e proliferação de fibroblastos (Brassolatti et al., 2016; Mathur et al., 2016; Almeida et al., 2017).

A LBI tem demonstrado influência na formação de novos vasos sanguíneos na região irradiada (Medeiros et al., 2017). Por mecanismos ainda não elucidados, a aplicação de laser em retalhos cutâneos de ratos induziu a expressão de HIF-1 α

("hypoxia inducible factor 1- α ") e VEGF, assim como modulou a atividade de MMP-2 (*metalloproteinase-2*), elementos presentes na cascata de angiogênese (Cury et al., 2013). Também ocorre síntese de endorfinas e decréscimo dos níveis de bradicinina relacionadas com a diminuição da dor (Felice et al., 2009; Silva et al., 2010). A analgesia promovida pelo laser de baixa intensidade está relacionada também com a redução dos níveis de PGE-2 e TNF- α (Diwan e Abid, 2016).

Diante dos possíveis benefícios da LBI no tratamento adjuvante de feridas cutâneas, se faz possível a associação entre cirurgias reconstrutivas e o laser, em doses adequadas, comprimento de onda e intervalos de irradiação (Esteves Júnior et al., 2012).

Objetivou-se com o presente trabalho a avaliação dos efeitos da laserterapia de baixa intensidade em enxertos cutâneos em ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) submetidos à diferentes doses assim como intervalos distintos entre sessões. Os enxertos cutâneos, submetidos ou não à laserterapia e os leitos doadores foram avaliados quanto à angiogênese, inflamação e cicatrização.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a angiogênese, inflamação e cicatrização de enxertos cutâneos em ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) submetidos à irradiação com laserterapia de baixa intensidade nas doses de 6 J/cm² e 10 J/cm² em intervalos de 3 e 5 dias, durante 15 dias de tratamento. Desse modo, determinando dose de laserterapia em intervalos de tempo factíveis na rotina da clínica cirúrgica veterinária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Instalações

O presente projeto foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV),

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus Jaboticabal – SP. Sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV, UNESP, Câmpus Jaboticabal – SP, protocolo número 010401/17.

4.2. Delineamento experimental

Foram realizados enxertos cutâneos em 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*), machos, com peso médio de 300 gramas, idade média de 56 dias, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Câmpus de Botucatu.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP/FCAV, Câmpus Jaboticabal-SP, de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e sob aprovação da CEUA. Durante todo o experimento os animais permaneceram em gaiolas plásticas individuais e forradas com maravalha de pinho, sendo mantidos em fotoperíodo sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura ambiente próxima a 23°C e ração comercial própria para a espécie e água *ad libitum*.

Os ratos foram submetidos à cirurgia reconstrutiva para confecção de enxertos cutâneos em malha, classificados como autoenxertos de espessura completa. O leito doador em região lombossacra foi mensurado nas dimensões de 2x2 cm, sendo aplicado em leito receptor para correção de defeito cutâneo de 3x3 cm em região dorsal de tórax, interescapular do mesmo animal.

Distribuiu-se os animais em cinco grupos, de acordo com dose de laserterapia de baixa intensidade aplicada em intervalos entre as irradiações, compostos por 8 ratos cada, conforme apresentado no Quadro 1.

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.

Grupo	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 9	Dia 10	Dia 12	Dia 15
G1 (Controle)								Coleta de Material
G2 (6 J/cm²)	x	x		x	x		x	
G3 (10 J/cm²)	x	x		x	x		x	
G4 (6 J/cm²)	x		x			x		
G5 (10 J/cm²)	x		x			x		

4.3. Protocolo anestésico

O protocolo anestésico consistiu em medicação pré-anestésica com midazolam¹ (2 mg/kg) e cetamina² (40 mg/kg) ambos pela via intramuscular; após 10 minutos aplicação via intramuscular de metadona³ (1 mg/kg). A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano⁴ na dose de 1 à 3% diluído em 100% de oxigênio, utilizando vaporizador anestésico com o objetivo de produzir plano anestésico cirúrgico.

4.4. Procedimento pré-cirúrgico

Após indução anestésica os animais foram submetidos à tricotomia em região dorsal desde a base da orelha até base da cauda (Figura 1A). Em região dorsal de pelve, compreendendo região de vértebras lombares, foi demarcado o leito doador do enxerto cutâneo, a partir de molde em filme radiográfico de 2x2 cm com caneta cirúrgica (Figura 1B). O leito receptor do enxerto cutâneo foi demarcado em região dorsal de tórax, compreendendo área interescapular a partir de molde em filme radiográfico de 3x3 cm com caneta cirúrgica (Figura 1B).

Posteriormente foi realizada antissepsia com clorexidine degermante⁵ à 2% em três ciclos, seguido da aplicação de clorexidine alcoólica⁶ à 0,5% em três ciclos.

1 Dormium® - Midazolam 5 mg, solução injetável – União Química – São Paulo, SP, Brasil.

2 Dopalen® - Cloridrato de Ketamina 1000 mg, solução injetável – Ceva – Paulínia, SP, Brasil.

3 Mytedom® - Cloridrato de Metadona 10 mg, solução injetável - Cristália – Itapira, SP, Brasil.

4 Isoforine® - Isoflurano – Cristália, Itapira, SP, Brasil

5 Riohex® 2% - 2% de digliconato de clorexidine – Rioquímica – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

6 Riohex® 0,5% - 0,5% de digliconato de clorexidine – Rioquímica – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

4.5 Procedimento cirúrgico

As feridas dermoepidérmicas, previamente demarcadas tanto em leito doador e receptor, foram realizadas com auxílio de lâmina de bisturi número 15 (Figura 1C).

Após a coleta de segmento de pele, incluindo epiderme e derme de leito doador (Figura 2A), o enxerto foi preparado para ser aplicado no leito receptor. O tecido subcutâneo do enxerto cutâneo foi removido com o auxílio de tesoura de íris, obtendo enxerto de espessura fina e posteriormente fenestrado no sentido longitudinal de forma aleatória antes da aplicação no leito receptor (Figuras 2B e 2C). Realizou-se as fenestras de modo a atravessar a epiderme e a derme com auxílio de lâmina de bisturi número 11, obtendo enxerto em malha (Figura 2D).

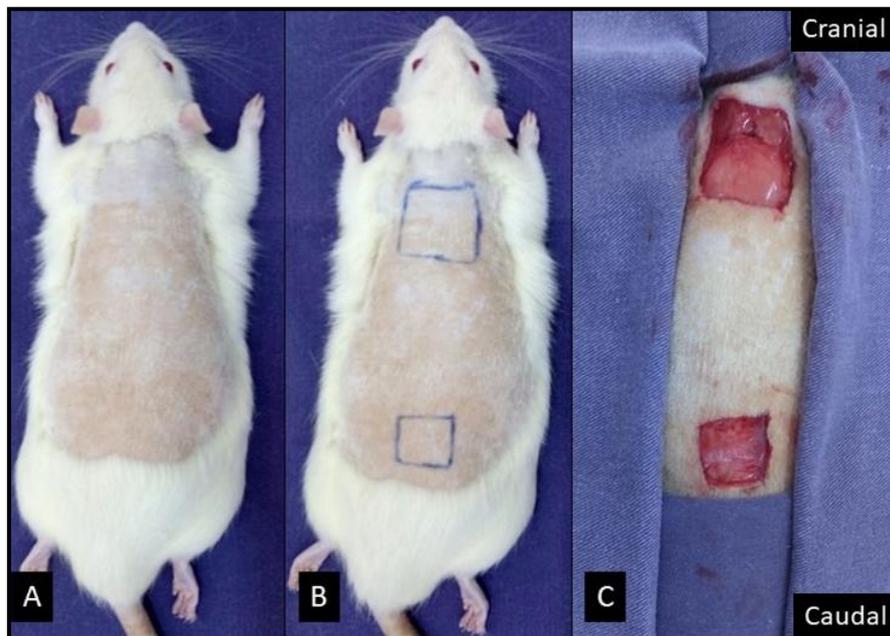


Figura 1. Imagens fotográficas de confecção de leitos doador e receptor para enxertia cutânea. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Posicionamento em decúbito ventral após indução anestésica, seguida de tricotomia ampla em região dorsal. B) Demarcação de 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.

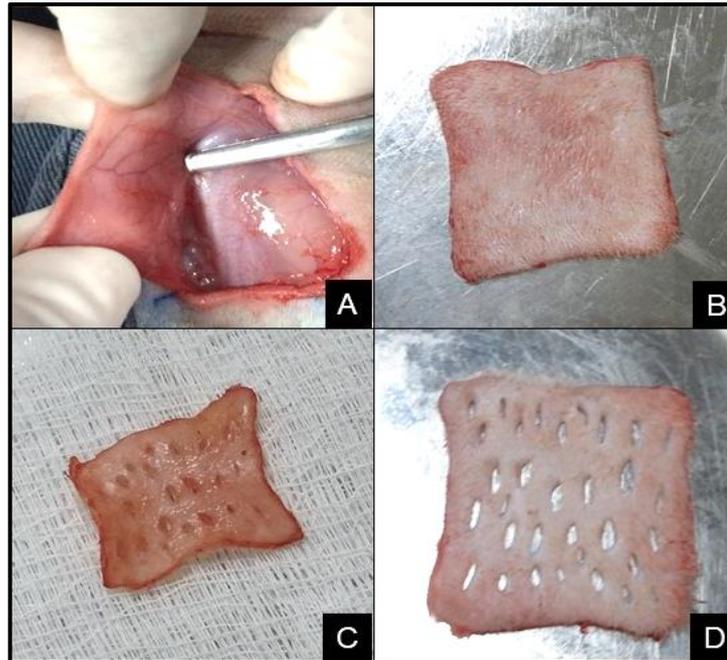


Figura 2. Imagens fotográficas de confecção de enxerto cutâneo em rato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Coleta de enxerto cutâneo em leito doador, incluindo epiderme e derme. Ramos terminais das artérias cutâneas diretas indicados por pinça anatômica. 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.

Posteriormente à confecção do enxerto cutâneo em malha foi realizada sua colocação em leito doador em região dorsal de tórax (interescapular), seguindo a síntese do enxerto com náilon 5.0, em padrão simples separado, sem tensão, iniciando pelas extremidades do enxerto (Figuras 3A e 3B). Em seguida, foi realizada dermorráfia de leito doador, com náilon 5.0, em padrão simples separado, sem tensão em forma de figura geométrica (Figuras 3A e 3B). Posteriormente institui-se curativo

compressivo com uso de gaze estéril sobre o enxerto, suturado em “tie over modificado” e mantido por três dias, durante fase de inosculação, de modo a permitir realização de laserterapia sobre o leito (Figura 4).

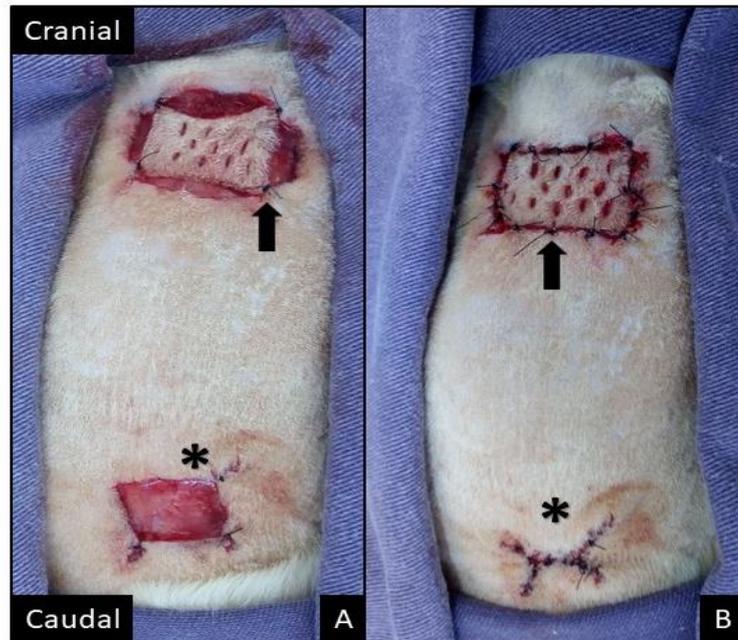


Figura 3. Imagens fotográficas de suturas de enxerto cutâneo e leito doador em rato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Jaboticabal-SP, 2019. A) Enxerto cutâneo em malha sobre leito receptor em região interescapular, pontos iniciais de sutura com náilon 5.0 em padrão simples separado, realizados nas extremidades do enxerto (seta preta). Em leito doador em região lombar, realizada dermorráfia 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).



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.

Os animais foram alocados de modo aleatório em cada grupo após a cirurgia, sendo realizado sorteio por avaliador cego ao término do procedimento cirúrgico. Desse modo, cada enxerto cutâneo foi confeccionado sem o conhecimento de qual grupo pertenceria aquele animal.

Ao término do procedimento cirúrgico todos os animais receberam terapia antimicrobiana em dose única de pentabiótico⁷ (1 mL/10kg), via intramuscular. Durante três dias subsequentes, via intradérmica cloridrato de petidina⁸ (10 mg/kg) como analgésico.

7 Bepeben® - Benzilpenicilina benzatina – 1200000UI – Teuto, Anapólis, GO, Brasil.

8 Cloridrato de Petidina 50mg, solução injetável – União Química, São Paulo, SP, Brasil.

4.6. Protocolo de laserterapia de baixa intensidade

Foi utilizado o aparelho de laserterapia de baixa intensidade Laserpulse Ibramed ® modelo L42⁹, associado com a ponteira de comprimento de onda de 660 nanômetros (nm), meio ativo de AlGaInP e 30 mW (megawatts) de potência. Os pontos de irradiação foram distribuídos nas margens e no centro do enxerto, assim como pontos equidistantes fora do enxerto (Figura 5A), de acordo com a área da ponteira de 660 nm e sua área de ação local de 2 cm², preconizada pelo fabricante.

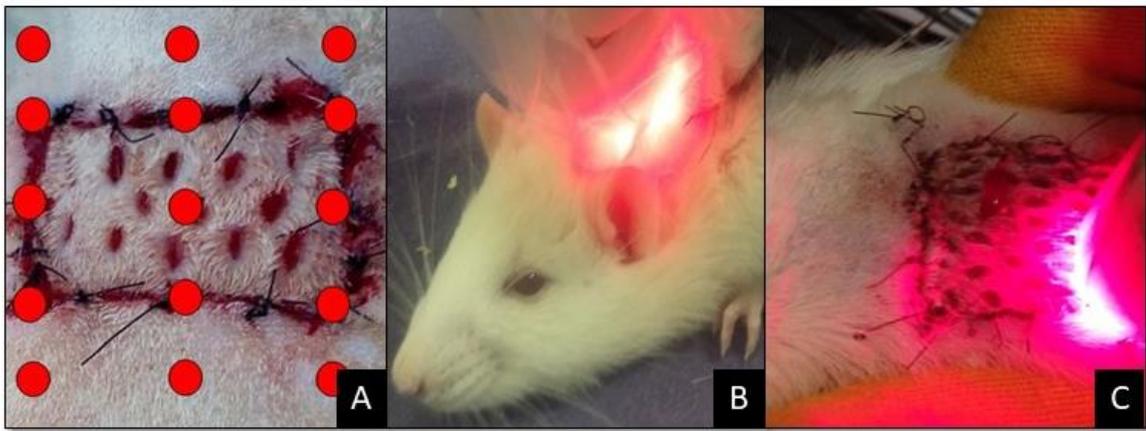


Figura 5. Imagem fotográfica de laserterapia de baixa intensidade em ratos após procedimento cirúrgico reconstrutivo. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Distribuição ilustrativa dos pontos de irradiação nas margens e centro do enxerto cutâneo (círculos 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.

Os animais eram contidos de acordo com os preceitos do Concea para cada sessão de LBI (Figura 5B). A ponteira do laser foi posicionada em ângulo de 90° em contato com a pele em cada ponto pré-determinado do enxerto, sendo 12 segundos/ponto na dose de 6J/cm² e 20 segundos/ponto na dose de 10J/cm², de acordo com o fabricante (Figura 5C). As sessões de LBI foram realizadas de acordo com dose e intervalo entre sessões estabelecidas para cada grupo (Quadro 1).

⁹ LaserPulse ® - aparelho de laserterapia, modelo L42 – Ibramed, Amparo, SP, Brasil

4.7. Avaliação macroscópica e coleta de material

As avaliações macroscópicas foram realizadas aos dias três, sete e 15 de pós-operatório, por avaliador cego. As variáveis consideradas para avaliação foram presença de exsudato, coloração do enxerto, edema e aspecto cosmético, sendo as variáveis quantificadas em escala de 0 a 3 (Apêndice A).

A eutanásia para coleta de material para análise seguiu os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo CONCEA. Após avaliação macroscópica ao 15^a dia de pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia mediante administração, via intraperitoneal de tiopental sódico¹⁰ na dose de 250 mg/kg.

Em seguida à eutanásia, as regiões de enxertia cutânea dos animais foram excisadas com margem de 1 cm de pele íntegra na largura e comprimento, tendo como limite de profundidade a fáscia muscular, incluindo todas as camadas de pele. Em região de leito doador foi coletado fragmento de 1x1 cm de pele, envolvendo epiderme e derme, tendo como limite de profundidade a fáscia muscular.

Todos os fragmentos coletados foram identificados e fixados em solução de formaldeído tamponado 10%, com pH entre 7,2-7,4. Após 48 horas as amostras foram imersas em álcool 70% e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Imunohistoquímica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para confecção das lâminas para avaliação microscópica.

4.8. Avaliação microscópica

As amostras de leito receptor e doador foram processadas e incluídas em blocos de parafina, para realização dos cortes histológicos. Os cortes foram realizados em micrótomo, com espessura de 2 µm, mantidos em estufa overnight à 37°C; posteriormente, os cortes foram hidratados em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol para proceder as reações específicas.

A avaliação microscópica foi realizada em fragmento tecidual de enxerto cutâneo e leito doador de cada animal. Para avaliação histoquímica utilizou-se a

¹⁰ Thiopentax® - tiopental sódico, 0,5g, pó estéril – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

marcação com hematoxilina-eosina, a qual foi avaliada quantitativamente, em cinco campos distintos, utilizando microscópio óptico em objetiva de 40x. Cada campo foi analisado quanto à avaliação quantitativa de fibroblastos, neutrófilos, proliferação vascular, necrose e hemorragia.

A avaliação histológica com Picrosirius foi realizada ao microscópio óptico sob luz polarizada Zeiss® modelo AX10, acoplado à câmera AxioCam Mrc Zeiss® e software AxioVision LE. Realizou-se fotomicrografias dos fragmentos, no Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Câmpus de Botucatu, sob supervisão do Professor Doutor Alexandre Hataka, mediante concessão de recurso do auxílio “UNESP 12/2017 – Mobilidade Discente na Pós-Graduação”.

A observação das fibras colágenas pela marcação com Picrosirius permite a diferenciação do colágeno tipo I e tipo III. De cada lâmina foram selecionados e fotomicrografados 10 campos histológicos com câmera digital (5.0 m) no aumento de 20x, selecionados da esquerda para a direita e de cima para baixo. As imagens obtidas foram analisadas mediante software ImageJ®, com o plug-in Thereshold Colour, obtendo o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com a seleção em medidas das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno foram padronizados para todas as imagens do seguinte modo, no plug-in Thereshold Colour: cor vermelha (colágeno tipo I) aplicou-se matiz 0-40 (Apêndice B), para cor verde (colágeno tipo III) aplicou-se matiz 45-120 (Apêndice C). Em ambos tipos de colágeno padronizou-se saturação de 0 a 255 e brilho de 5 a 225, conforme descrito por Bedoya et al. (2016).

Para análise imuno-histoquímica, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, com adesivos comerciais (3-aminopropiltriétoxi-silano – Sigma Chemical® – C.O. – United States). Na sequência, foram mantidos em estufa à 60° por 1 hora, procedendo à desparafinização em soluções decrescentes de xilol e álcool. Ato contínuo, os cortes foram submetidos aos anticorpos específicos (Quadro 2). O sistema de detecção utilizado seguindo o preconizado pelo fabricante. Todos os anticorpos tiveram como controle positivo fragmento de pele íntegra obtida de rato não submetido à enxertia cutânea ou irradiação de LBI.

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 da FCAV/UNESP, 2019.

Anticorpo (Empresa)	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação	Sistema de Detecção
CD31 (Abcam)	Policlonal	1:50	Pepsina Porcine Gastric Mucosa Sigma life science – United Kingdom Estufa 37°	120 min	Novolink™ Polymer Detection Systems – Leica Biosystems New Castle Ltda – United Kingdom
MAC387 (Dako)	Monoclonal	1:100	Novocasta™ Epitope Retrieval Solutions pH9 Leica Biosystems New Castle Ltda - United Kingdom, Banho- maria	120 min	Novolink™ Polymer Detection Systems – Leica Biosystems New Castle Ltda – United Kingdom
COX-2 (Dako)	Monoclonal	1:100	Novocasta™ Epitope Retrieval Solutions pH6 Leica Biosystems New Castle Ltda – United Kingdom., Banho- maria	120 min	Novolink™ Polymer Detection Systems – Leica Biosystems New Castle Ltda – United Kingdom.

O índice angiogênico para CD31 foi determinado pela técnica de contagem microvascular (CMV). Foram analisadas as áreas com maior número de vasos na profundidade da lesão, sendo qualquer célula ou grupo celular endotelial, imunomarcado positivamente separado dos microvasos adjacentes, e de outros elementos do tecido conjuntivo, desta forma, considerado como vaso unitário, assim como também, os vasos contendo lúmen. A contagem dos vasos foi realizada em cinco campos, selecionados previamente com elevada densidade vascular, no aumento de 40X, utilizando microscópio óptico de luz. A CMV foi determinada duas vezes por um único avaliador, em dois momentos diferentes e expressa com número médio de vasos em cada caso estudado.

A enzima COX-2, responsável pela síntese de prostaglandina no local da inflamação, foi mensurada por meio do percentual de expressão, obtido pela contagem de células imunomarcadas com o auxílio do software ImageJ®. Foram contados cinco campos para cada amostra analisada de acordo com o número de células imunomarcadas por campo. A contagem de macrófagos foi realizada pela contagem de 10 campos no aumento de 20x, para cada animal, de acordo com o número de células imunomarcadas por campo.

4.9. Análise estatística

As variáveis macroscópicas e médias das avaliações microscópicas, em relação aos grupos controle e experimental foram submetidas à análise estatística pela aplicação da análise de variância (ANOVA), aplicando teste de Tukey (5%) e teste F.

Os dados de colagenização dos diferentes tipos de fibras colágenas, segundo o grau de diferenciação foram comparados por análise de variância (ANOVA) para um delineamento inteiramente ao acaso, considerando valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) significativos. Para as análises utilizou-se o programa computacional Sistema R.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica

5.1.1. Exsudato

As análises macroscópicas realizadas por avaliador cego aos dias três, sete e 15 de pós-operatório não demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tratamento quanto à variável exsudato. Ao teste Tukey foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) com relação à variável exsudato ao D7 em relação aos dias D3 e D15 (Figura 6), independente do tratamento.

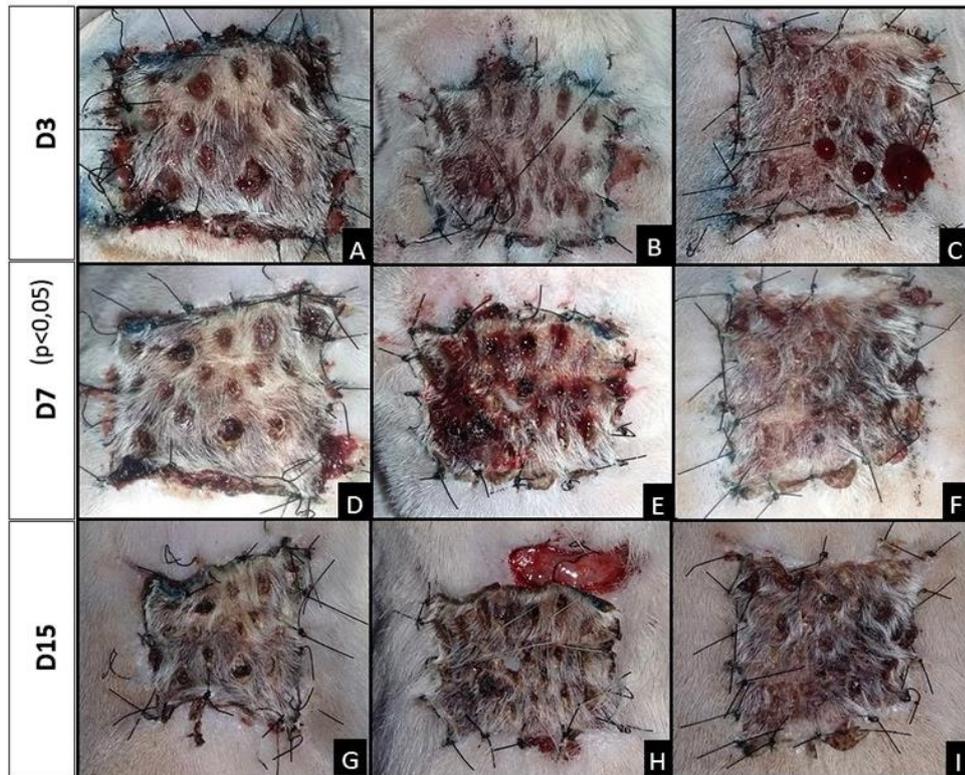


Figura 6. Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução das feridas quanto à variável exsudato. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo (G1) em D3, D7 e D15, respectivamente. B, E, H) Enxerto 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.

5.1.2. Coloração

Em relação à variável coloração do enxerto cutâneo à análise de variância (ANOVA), a LBI não promoveu diferenças estatísticas quanto à coloração dos enxertos cutâneos, enquanto houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos dias de observação (três, sete e 15). Ao teste Tukey houve diferença significativa ($p < 0,05$) aos dias D7 em relação ao D15, assim como D3 em relação ao D15 (Figura 7), independente do grupo.

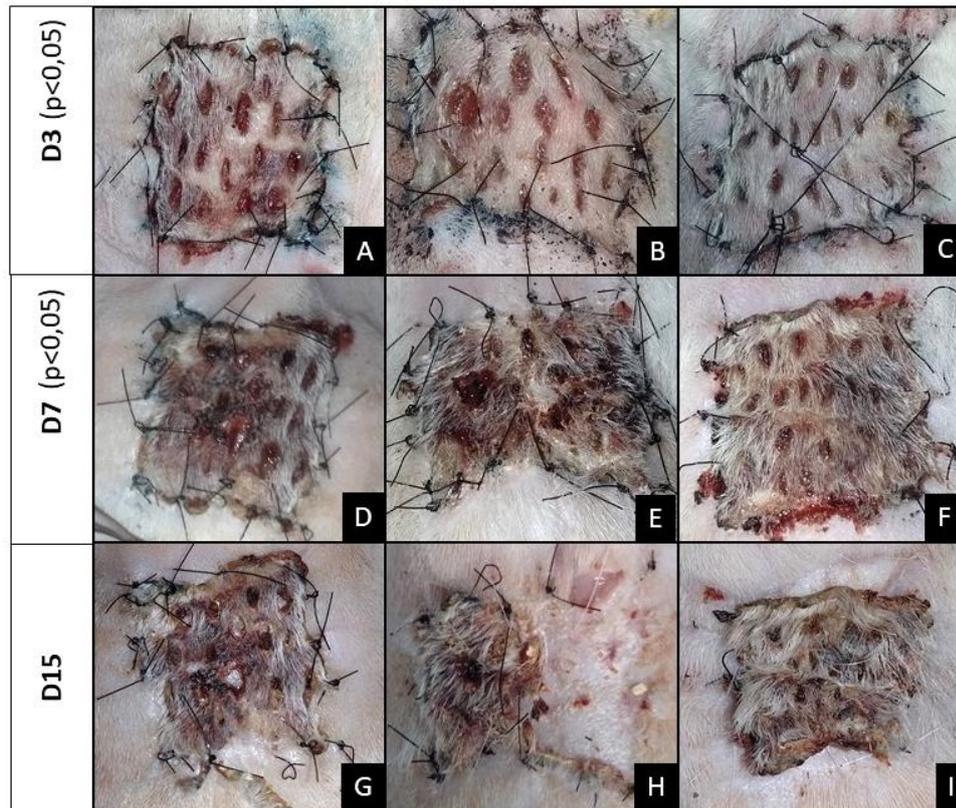


Figura 7. Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução da ferida quanto à variável coloração. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo de animal (G4) em D3, D7 e D15, respectivamente. B, 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.

5.1.3 Edema

Ao aplicar a análise de variância (ANOVA) sobre a variável edema, foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos dias analisados, enquanto não houve diferença estatística entre os tratamentos propostos. O teste Tukey apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre D7 e D15, assim como entre D15 e D3, independente da LBI.

5.1.4 Aspecto cosmético

A análise de variância (ANOVA) aplicada sobre os valores do aspecto cosmético dos enxertos cutâneos apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos dias analisados. Ao teste Tukey, as médias relacionadas aos dias apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos dias D7 e D15 em relação ao D3 (Figura 8), independente da LBI.

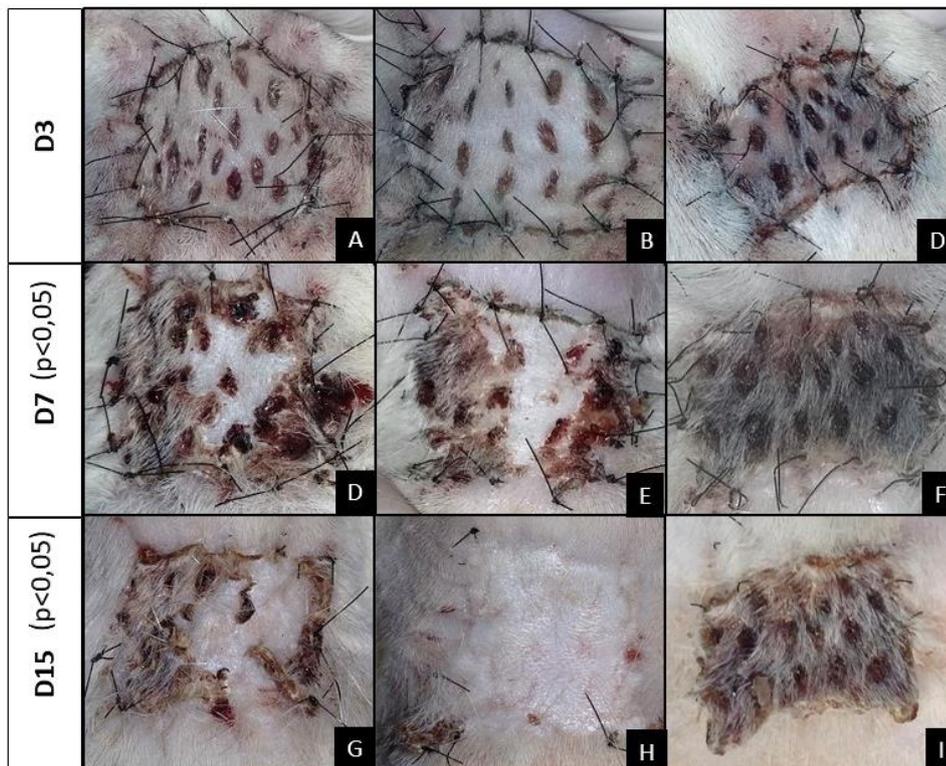


Figura 8. Imagens fotográficas de enxertos cutâneos em ratos submetidos à LBI, apresentando a evolução da ferida de acordo com o aspecto cosmético. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A, D, G) Enxerto cutâneo de animal (G5) em D3, D7 e D15, respectivamente. 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.

5.2. Avaliação Microscópica

5.2.1. Fibroblastos

A avaliação quantitativa de fibroblastos (Figura 9) à análise de variância (ANOVA) demonstrou diferença estatística ($p < 0,05$) em G4 em relação aos demais grupos. Observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de fibroblastos no G4, quando comparado aos enxertos dos demais grupos, assim como sobre leite doador de G4.

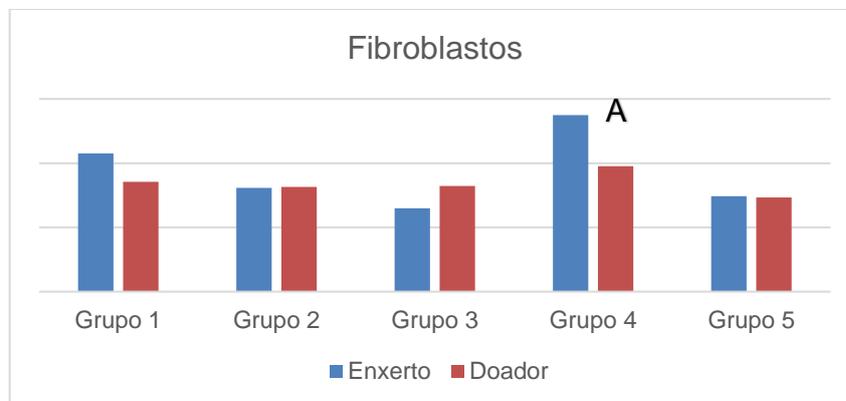


Figura 9. Representação gráfica da análise quantitativa de fibroblastos em enxertos cutâneos e leite doador, mediante análise de variância (ANOVA). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Diferença estatística ($p < 0,05$) em G4 em relação a contagem de fibroblastos em enxertos cutâneos, quando comparado aos demais grupos, assim como em leite doador do mesmo grupo.

5.2.2. Neutrófilos

Com relação aos neutrófilos é possível observar diferença estatística ($p < 0,05$) com relação aos leitos, independente do grupo de tratamento. Enxertos cutâneos apresentaram maior média estatística de neutrófilos comparados aos leitos doadores, independente do grupo. Entretanto, observa-se menor tendência de número de neutrófilos em enxertos cutâneos de G2 e leitos doadores em G4 (Quadro 3).

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.

Grupo (Tratamento)	Contagem de Neutrófilos *	
	Enxerto Cutâneo	Leito Doador
G1 (Controle)	414	221
G2 (6 J/cm ² a cada 3 dias)	234	255
G3 (10 J/cm ² a cada 3 dias)	429	268
G4 (6 J/cm ² a cada 5 dias)	360	135
G5 (10 J/cm ² a cada 5 dias)	325	245

(*) Contagem de neutrófilos por análise quantitativa em 5 campos em aumento em 40X.

5.2.3. Proliferação Vascular

A avaliação quantitativa de vasos sanguíneos não apresentou diferença estatística em relação aos grupos de tratamento (Quadro 4). Entretanto os enxertos cutâneos, de modo geral apresentaram maior quantidade de vasos sanguíneos em relação aos leitos doadores, independente do grupo.

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.

Grupo (Tratamento)	Contagem de Vasos Sanguíneos *	
	Enxertos Cutâneos	Leitos Doadores
G1 (Controle)	140	77
G2 (6 J/cm ² a cada 3 dias)	150	104
G3 (10 J/cm ² a cada 3 dias)	175	81
G4 (6 J/cm ² a cada 5 dias)	127	128
G5 (10 J/cm ² a cada 5 dias)	141	98

(*) Contagem de vasos sanguíneos por análise quantitativa em 5 campos em aumento de 40X.

5.2.4. Necrose

Ao teste não paramétrico para presença de necrose, aplicado sobre enxertos cutâneos e leitos doadores, é possível observar diferença estatística ($p < 0,05$) quanto aos grupos e leitos. Os enxertos cutâneos de G3 apresentam maior média, significativa ($p < 0,05$) sobre enxertos cutâneos de G2. Por sua vez, enxertos cutâneos de G2, apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) quanto aos enxertos cutâneos de G1, G4, G5 e leitos doadores de G2, sendo estes diferentes de modo significativo de leitos doadores de G1, G3, G4 e G5 (Figura 10).

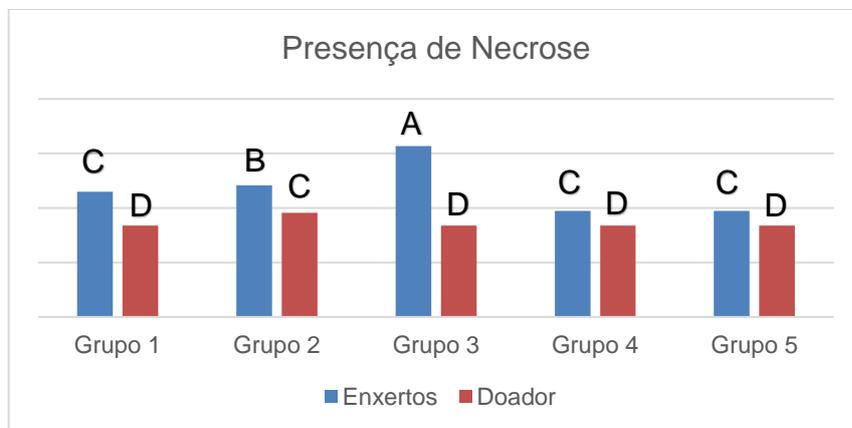


Figura 10. Representação gráfica de teste não paramétrico aplicado sobre presença de necrose em enxertos cutâneos e leitos doadores de acordo com cada grupo de tratamento, aos 15 dias de pós-operatório. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Diferença estatística ($p < 0,05$) 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 ($p < 0,05$).

5.2.5. Hemorragia

Ao avaliar a presença de hemorragia foi possível observar, a partir da análise de variância (ANOVA), diferença estatística ($p < 0,05$) dos enxertos cutâneos sobre os leitos doadores. Ao teste Tukey as amostras de enxertos cutâneos em G3 e G1 apresentaram valores significativos ($p < 0,05$) quando comparados aos enxertos de G2 e G4. Por sua vez, os enxertos cutâneos de G2 e G4 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos enxertos de G5 (Figura 11).

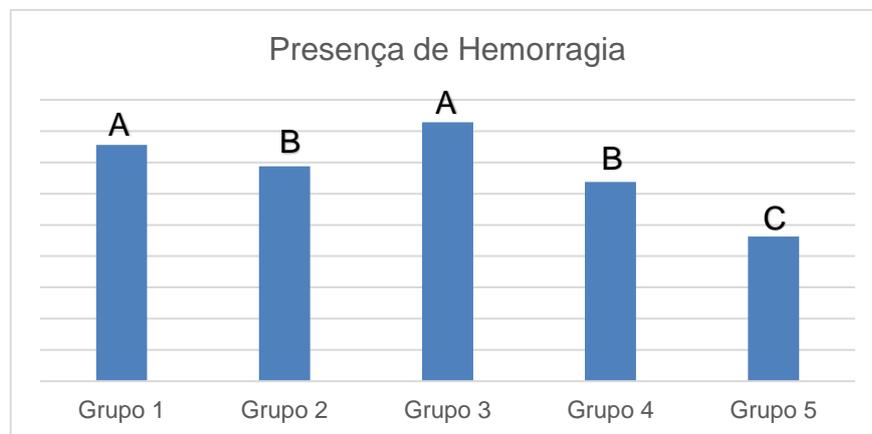


Figura 11. Representação gráfica da análise quantitativa da presença de hemorragia em enxertos cutâneos em grupos experimentais, aos 15 dias de pós-operatório. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Enxertos cutâneos em G3 e G1 apresentaram maior quantidade 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.

5.3. Macrófagos

As médias obtidas de enxertos em cada grupo de tratamento em relação à contagem de macrófagos (Quadro 5) por meio de análise imuno-histoquímica não

demonstraram diferença estatística quanto à análise de variância (ANOVA). Entretanto, observou-se menor tendência na contagem de macrófagos em G5.

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.

Grupo (Tratamento)	Média de Macrófagos* (p>0,05)
G1 (Controle)	901
G2 (6 J/cm ² a cada 3 dias)	978
G3 (10 J/cm ² a cada 3 dias)	769
G4 (6 J/cm ² a cada 5 dias)	784
G5 (10 J/cm ² a cada 5 dias)	681

(*) Média de macrófagos obtidos pela contagem de 10 campos no aumento de 20x.

5.4. CD31

Em relação à mensuração de CD31 (Quadro 6) não houve diferença estatística entre os grupos pela análise de variância (ANOVA). Porém, observou-se tendência de maior expressão de CD31 em G1 e menor expressão em G2.

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.

Grupo (Tratamento)	Média de Contagem de CD31*
Grupo 1 (Controle)	449
Grupo 2 (6J/cm ² a cada 3 dias)	291
Grupo 3 (10J/cm ² a cada 3 dias)	320
Grupo 4 (6J/cm ² a cada 5 dias)	270
Grupo 5 (10J/cm ² a cada 5 dias)	303

(*) Índice angiogênico para CD31 determinado pela técnica de contagem microvascular (CMV).

5.5. COX-2

Em relação à mensuração de COX-2 (Quadro 7) não houve diferença estatística entre os grupos pela análise de variância (ANOVA). Entretanto foi possível inferir menor tendência na expressão de COX-2 em G3.

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, 2018.

Grupo (Tratamento)	Média de Expressão de COX-2*
Grupo 1 (Controle)	228,181
Grupo 2 (6J/cm ² a cada 3 dias)	177,83
Grupo 3 (10J/cm ² a cada 3 dias)	165,947
Grupo 4 (6J/cm ² a cada 5 dias)	188,763
Grupo 5 (10J/cm ² a cada 5 dias)	238,046

(*) COX-2 mensurada por meio do percentual de expressão por área de campo analisada.

5.6. Colagenização

5.6.1. Colágeno tipo I – vermelho

Os dados de porcentagem de colágeno tipo I (vermelho) entre leito doador e enxerto cutâneo em cada grupo de tratamento, demonstraram, de acordo com a análise de variância (ANOVA), diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos (Figura 12). Observou-se diferença significativa entre a expressão de colágeno tipo I – vermelho em G1 e G5.

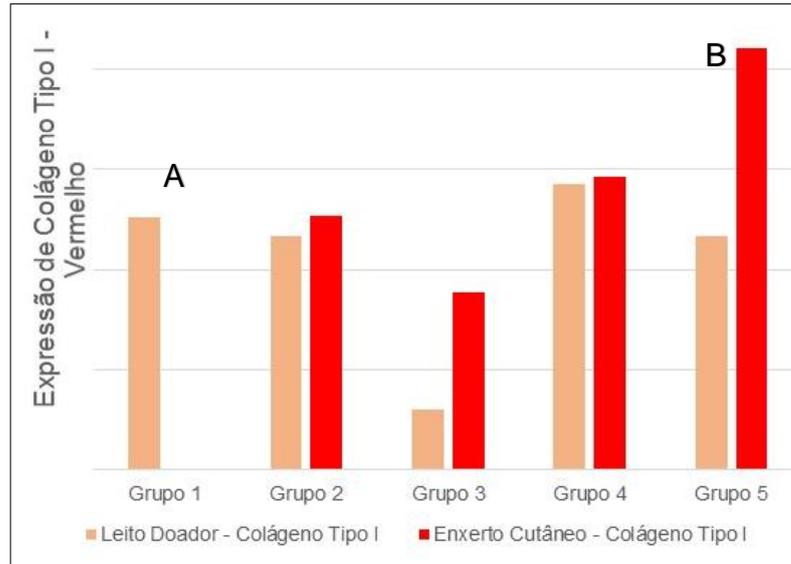


Figura 12. Representação gráfica em colunas da média de expressão de colágeno tipo I – vermelho em leito doador e enxerto cutâneo nos grupos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP,2019. A) Diferença significativa ($p<0,05$) entre leito doador e enxerto cutâneo em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

5.6.2. Colágeno tipo III – verde

De acordo com a análise de variância (ANOVA) para colágeno tipo III – verde entre leito doador e enxerto cutâneo em cada grupo de tratamento, notou-se diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos (Figura 13). Observou-se diferença significativa entre a expressão de colágeno tipo III – verde em G1 e G4.

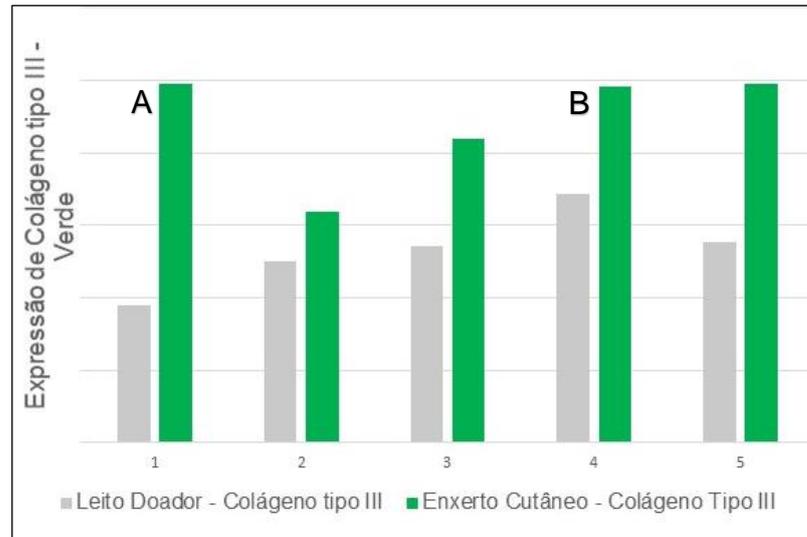


Figura 13. Representação gráfica em colunas da média de expressão de colágeno tipo III – verde em leito doador e enxerto cutâneo nos grupos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 2019. A) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre leito doador e enxerto cutâneo em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

6. DISCUSSÃO

Optou-se pela aplicação da enxertia cutânea em malha com a hipótese de reduzir a coleção de seroma e possibilitar a expansão do fragmento. A mesma hipótese foi proposta por Paim et al. (2002), os quais identificaram que a confecção de janelas longitudinais no enxerto permitiu drenagem de fluido entre leitos, proporcionando maior adesão e capacidade de expansão de 3:1, contribuindo com os achados do presente estudo.

De acordo com Fortuna et al. (2017) houve aumento do número de fibroblastos e expressão de colágeno após a interrupção da laserterapia, indicando ação do laser por período relativamente longo. Diante dos resultados, é possível observar benefício ao aplicar LBI em dias alternados, uma vez que a irradiação a cada 3 ou 5 dias promoveu expressão de colágeno tipo I e tipo III, assim como tendência em modular a inflamação.

A LBI não promoveu alterações em relação ao aspecto cosmético dos enxertos cutâneos, sendo as alterações apenas em relação aos dias avaliados. A região interescapular foi selecionada como leito receptor do enxerto cutâneo devido a menor interferência do animal no local, porém permitiu mobilidade do enxerto sobre o leito durante movimentação dos membros torácicos, favorecendo a formação de exsudato. De acordo com Riggs et al. (2015) a localização do enxerto é fator preditor para o sucesso da técnica reconstrutiva, desse modo, a mobilidade do enxerto prejudicou a fase de inosculação, a qual é caracterizada pela anastomose de pequenos capilares entre o leito e o enxerto (Stanley et al., 2013; Pazzini e Moraes, 2015).

Em trabalho realizado por Kitamura et al. (2017), após a retirada de bandagem compressiva “tie-over”, enxertos cutâneos em malha apresentavam-se com coloração rosa escuro. Ao longo do período observado, obtiveram os enxertos cutâneos róseos e com áreas de epitelização. O mesmo trabalho relatou que enxertos cutâneos que não aderiram ao leito apresentavam-se esbranquiçados. No presente trabalho, os enxertos cutâneos apresentaram coloração cianótica ao longo dos dias analisados, independente do tratamento utilizado.

De acordo com Swain (2007) os enxertos cutâneos podem ser cianóticos quando aplicados em ferida durante as primeiras 48 horas, assumindo coloração avermelhada cerca de 72 a 96 horas de pós-operatório. Por volta do 7^a ou 8^a dia, espera-se o enxerto vermelho, caso ocorra sobrevida completa deste. Diferentemente do presente estudo, onde os enxertos cutâneos apresentaram coloração mais escura em D3 e D7.

Processo de necrose avascular é indicado por áreas persistentemente pálidas, as quais sofrerão necrose e esfacelamento. A necrose isquêmica seca caracteriza-se como mancha de coloração enegrecida sobre o enxerto cutâneo. As porções mais profundas da derme revascularizam, porém a epiderme e a porção superficial da derme sofrem degeneração, formando escara de coloração escura sobre a superfície. Após o esfacelamento ou desbridamento da necrose epidérmica, a derme viável subjacente reepiteliza a partir de anexos da derme presente (Swain, 2007). Corroborando os achados do presente trabalho, aonde não se observou áreas extensas de necrose ou úlceras no tecido cicatricial subjacente aos enxertos cutâneos, independente do grupo.

A aplicação de laser em diferentes doses e intervalos não promoveu alterações significativas na presença de edema, uma vez que os enxertos não irradiados (G1) apresentaram redução do edema a partir de D7 semelhante aos demais grupos. Espera-se que ocorra oxigenação e nutrição adequadas a partir do 5^a dia de pós-operatório, assim como maturação dos vasos recém-formados, eventos que ocorreram independente da LBI. Em estudo realizado por Medrado et al. (2003), feridas cutâneas induzidas em região dorsal de ratos e submetidas à LBI apresentaram redução de edema nas feridas irradiadas em 24 horas de pós-operatório. Ao longo dos dias analisados, porém, não houve diferença significativa na mensuração de edema nas feridas entre os grupos irradiados e controle, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Devido à necrose epidérmica, como citado anteriormente por Swain (2007), o aspecto cosmético dos enxertos foi considerado regular a ruim a partir de D7. Quando a camada basal e a de células fusiformes são afetadas, o enxerto está completamente perdido (Alves et al., 2009). Porém diante das avaliações microscópicas é possível inferir que houve cicatrização a partir da derme e o aspecto cosmético do enxerto não definiu seu processo cicatricial. Segundo a literatura, em cerca de 20% dos casos, o enxerto cutâneo completo sofre algum grau de necrose, afetando em sua grande maioria as camadas granular, lúcida e córnea, sem afetar a derme, diferentemente de quando ocorre úlcera profunda (Amâncio et al., 2006; Goto et al., 2017).

A angiogênese é um processo essencial para a cicatrização, possibilitando oxigenação e nutrição adequadas ao tecido. No presente trabalho, observa-se tendência em maior densidade vascular em enxertos cutâneos, quando comparados ao leito doador, além de maior contagem microvascular de CD31 em enxertos de G1. Segundo Fortuna et al. (2017), ao utilizarem LBI em feridas induzidas em ratos com 4 J/cm² e 670nm, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem microvascular de CD31, sendo o grupo irradiado com maior número de vasos ao 14^a dia de pós-operatório, diferindo do trabalho proposto. De acordo com Kazemikoo et al. (2018) e Dahmardehei et al. (2016) é possível que a LBI sobre feridas beneficie a perfusão sanguínea, além da angiogênese, justificando os resultados obtidos quanto a cicatrização não estar relacionada com a proliferação vascular.

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à quantidade de macrófagos, porém observa-se uma tendência da LBI modular a resposta inflamatória em G3, G4 e G5, ao apresentarem menos macrófagos que os demais grupos. Entretanto, Carvalho et al. (2010) ao induzirem feridas cutâneas em ratos diabéticos e trata-las com LBI com 10 J/cm² e 660 nm, obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) na contagem de macrófagos entre grupo tratado e controle. Os macrófagos são responsáveis pela organização e manutenção do processo cicatricial, além de realizarem o desbridamento de tecido desvitalizado e liberação de citocinas durante o reparo tecidual (Carvalho et al., 2010). O comportamento das fibras colágenas está relacionado à atividade dos macrófagos, sendo que aos 14 dias de avaliação observa-se diminuição do número de macrófagos e as fibras colágenas se apresentam densas e organizadas (Carvalho et al., 2010). De modo a corroborar com o presente resultado, a menor média de macrófagos foi observada em G5, associada a maior porcentagem de colágeno tipo I – vermelho em enxertos cutâneos.

É possível inferir, diante dos resultados que houve uma tendência da LBI modular a expressão de COX-2 em G3, ao apresentar menor média. Esteves Júnior et al. (2012) obtiveram menor expressão de COX-2 em retalhos subdérmicos irradiados com LBI, analisados aos 7 dias pós-operatórios, diferindo estatisticamente do grupo controle. Enquanto Renno et al. (2011) não obtiveram diferença estatística entre grupo controle e grupo irradiado com LBI ao mensurar os valores de COX-2 em queimaduras induzidas em ratos aos 14 dias de pós-operatório. Ambos trabalhos utilizaram laser de comprimento de onda de 660nm e potência de 110mW, enquanto Esteves et al., (2012) utilizaram a dose de 260,7J/cm² realizando a irradiação do retalho subdérmico em 3 dias consecutivos de pós-operatório e Renno et al. (2011) utilizaram LBI na dose de 20J/cm² por 14 dias consecutivos de pós-operatório. Ambos trabalhos diferem do presente estudo em que se utilizou de 6 ou 10J/cm² e potência de 30mW, logo é possível inferir que uma maior dose e potência de laserterapia beneficiam a redução da expressão de COX-2 durante a cicatrização (Silva et al., 2016).

A presença de células inflamatórias nas amostras analisadas permite inferir tendência da LBI reduzir a contagem de neutrófilos por campo. Porém, é possível observar menor contagem de neutrófilos em leitos doadores. Diferindo do proposto

por Medeiros et al. (2017), onde houve baixa presença de neutrófilos por campo de 40X em feridas cutâneas induzidas em ratos e irradiadas com LBI na dose de 4 J/cm², comprimento de onda de 660 nm a cada 48 horas. Segundo Medrado et al. (2003) em trabalho proposto com o uso de LBI com doses de 4 e 8 J/cm² em feridas, houve redução da presença de neutrófilos durante os dias avaliados, com diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos irradiados e grupo controle ao terceiro dia de pós-operatório; esta diferença não foi observada ao 14^a dia de pós-operatório entre os grupos, corroborando com o presente trabalho.

Independente do grupo analisado, todos os enxertos cutâneos sofreram necrose epidérmica, como citado por Swain (2007), porém apresentaram tecido cicatricial subjacente evidenciado pelos resultados. Entretanto, assim como relatado por Núñez et al. (2012), não foram observados anexos da pele em região de reparo tecidual. A maior expressão de colágeno tipo III – verde, foi observada em enxertos G4, associado com maior contagem de fibroblastos. Porém, em enxertos G5 é possível observar maior expressão de colágeno tipo I – vermelho. Assim, é possível inferir que a dose de 10 J/cm² a cada 5 dias (G5) permitiu a maturação do colágeno. Corroborando com os resultados expostos, Brassolatti et al. (2016) sugere que a utilização de maiores doses de energia estimula a formação de tecido de granulação. Em estudo realizado por Garcia et al. (2012), em feridas induzidas, demonstrou que a LBI estimulou o reparo tecidual, assim como induziu atividade mitótica de células epiteliais e aumentou a síntese de colágeno, assim como no presente estudo, as áreas irradiadas apresentaram maior quantidade de fibroblastos, assim como expressão de colágeno. Em trabalho realizado por Silva et al. (2013) é possível observar resultados semelhantes, atribuindo o uso de LBI ao aumento significativo na deposição de colágeno, devido a indução da proliferação celular e pelo processo de síntese e secreção de proteínas.

Ao observar a expressão de colágeno tipo III – verde, considerado imaturo, nos enxertos cutâneos, há maior expressão em G1, G4 e G5, demonstrando que a LBI não influenciou positivamente na expressão desse colágeno. Entretanto, a irradiação de LBI promoveu a formação de tecido de granulação, uma vez que G1 não apresenta fibras colágenas tipo I – vermelha, diferente dos demais grupos. O presente resultado vai de encontro com achados de Brassolatti et al. (2016), que observaram atraso na

síntese de fibras colágenas maduras em grupo controle ou com menor dose de laser aplicada.

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/cm² ou 10 J/cm² 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. REFERÊNCIAS¹¹

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) Agendes 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, Vitoria 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, Huppés RR, De Nardi AB, Pazzini JM (2015) Introdução à anatomia. In.: Castro, JLC, Huppés, 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 α 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, Zafanelli 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

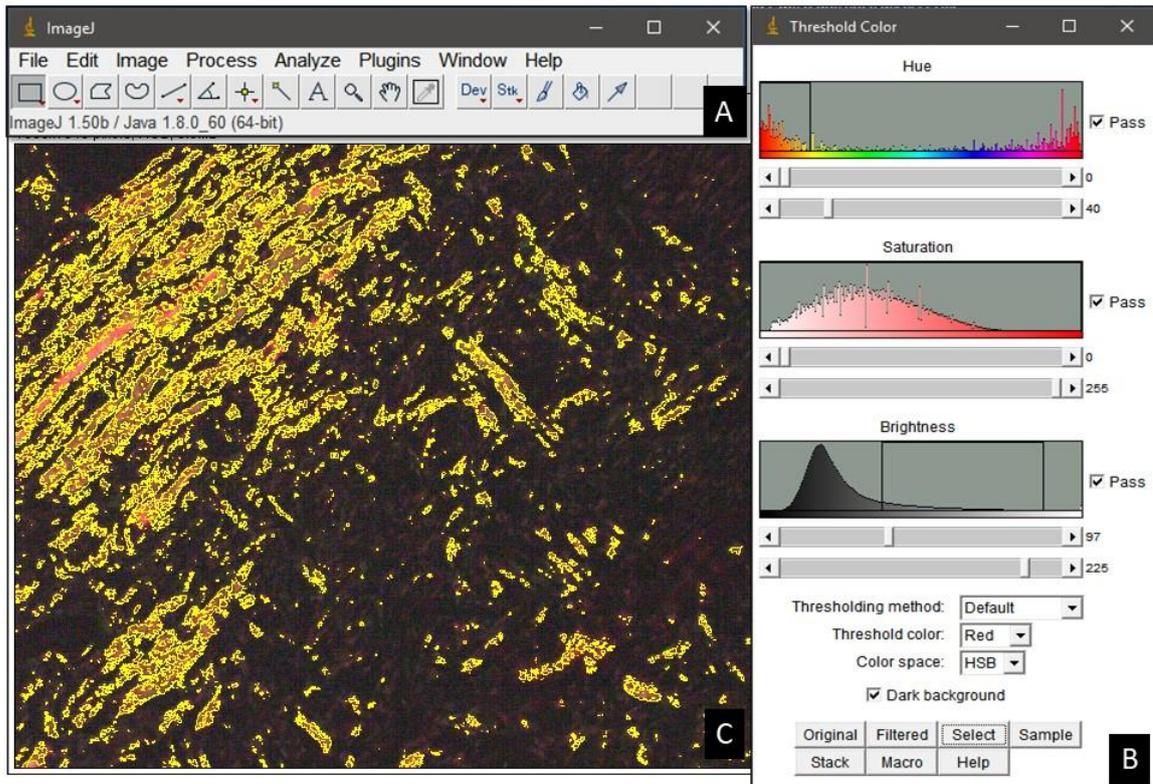
APÊNDICE A

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

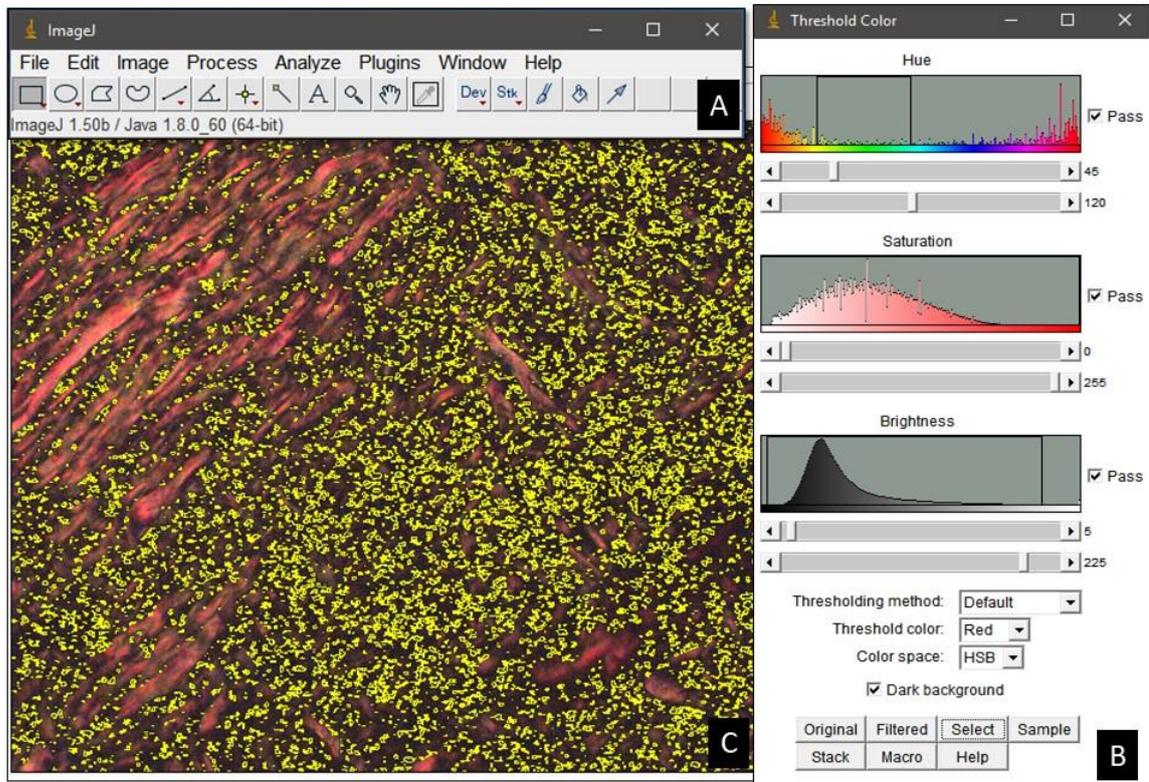
(Adaptado de Paim et al., 2002)

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 Picosirius 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