

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISES MACRO E MICROSCÓPICA DE ENXERTOS  
CUTÂNEOS POR SEMEADURA APÓS LASERTERAPIA DE  
BAIXA INTENSIDADE.

Elisângela Barboza da Silva  
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Outubro 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISES MACRO E MICROSCÓPICA DE ENXERTOS  
CUTÂNEOS POR SEMEADURA APÓS LASERTERAPIA DE  
BAIXA INTENSIDADE.

Elisângela Barboza da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lúcia Maniscalco

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Outubro 2009

S237e Silva, Elisângela Barboza da  
Análises macro e microscópica de enxertos cutâneos por  
semeadura após laserterapia de baixa inensidade. – – Jaboticabal,  
2009  
, 75 f. 42 ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientador: Cintia Lúcia Maniscalco  
Banca examinadora: Gustavo Garkalns de Souza Oliveira, Lucia  
Helena Vasques, Paola Castro Moraes, Gilson Helio Toniollo  
Bibliografia

1. Cirurgia, 2. Anaplastia, 3.Cicatrização, 4.Laser, 5. Ratos Título.  
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de  
Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ELISÂNGELA BARBOZA DA SILVA** – filha de Rubens Barboza da Silva e Shirley Aparecida Dada, nasceu em Araraquara – SP, no dia 11 de julho de 1979. Em novembro de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP/Jaboticabal. Tornou-se Mestre em Cirurgia Veterinária nesta mesma instituição em fevereiro de 2006. Neste mesmo ano ingressou no curso de Doutorado do mesmo programa e iniciou carreira docente como colaboradora na Universidade Estadual do Centro-Oeste, na cidade de Guarapuava – PR, onde até hoje ocupa este cargo.

Quem planta flores, planta beleza e perfume por alguns dias. Quem planta árvores, planta sombra e frutos por anos, talvez séculos. Quem planta idéias verdadeiras, planta para a eternidade.  
Jesus Cristo

Dedico este trabalho e esta conquista

A Deus que guia meus passos

Aos meus pais, Shirley e Rubens, e meu irmão Jéferson pelo amor,  
carinho, apoio e incentivo

Aos meus amigos próximos e distantes que me incentivaram nesta etapa  
da minha formação.

Agradeço,

A Deus por permitir mais esta vitória;

A minha orientadora Profa. Dra. Cíntia Lúcia Maniscalco por acreditar e confiar no meu potencial e no meu trabalho;

As amigas Meire e Nicole pelo auxílio e disposição para correr com meus papéis quando eu estava distante. Muito obrigada!!!

Aos amigos conquistados durante esta etapa : Deonísia, Danila, Fernanda, Greyson, Luciana, Marcos, Heloísa, Ricardo e Zara. Obrigada pelos bons momentos de convivência!!

A Clínica Escola Veterinária (CEVET) da Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO local onde desenvolvi este trabalho.

Ao Prof. MSc. Ivo Kepers, pelo auxílio e pelo empréstimo do aparelho de laser.

Ao Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra pelo auxílio no preparo e leitura das lâminas deste trabalho.

Aos demais colegas do Departamento de Veterinária da UNICENTRO,  
alunos, estagiários, orientados com quem muito aprendi nestes anos

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram e torceram  
por esta conquista.



## SUMÁRIO

|                                                | Página |
|------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE FIGURAS . . . . .                     | .vii   |
| LISTA DE TABELAS . . . . .                     | .ix    |
| RESUMO . . . . .                               | x      |
| ABSTRACT . . . . .                             | xi     |
| 1. INTRODUÇÃO . . . . .                        | .01    |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA . . . . .             | .02    |
| 2.1.Enxerto cutâneo . . . . .                  | .02    |
| 2.2.Enxertos por sementeira . . . . .          | .03    |
| 2.3.Biomembrana natural de látex . . . . .     | .04    |
| 2.4.Laser e cicatrização . . . . .             | .05    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .                | .11    |
| 3.1.Animais . . . . .                          | .11    |
| 3.2.Aparelho . . . . .                         | .12    |
| 3.3.Procedimento experimental . . . . .        | .13    |
| 3.3.1. Preparação do leito receptor . . . . .  | .13    |
| 3.3.2. Realização dos enxertos . . . . .       | .15    |
| 3.4. Histologia . . . . .                      | .18    |
| 4. RESULTADOS . . . . .                        | .19    |
| 4.1.Macroscópicos . . . . .                    | .19    |
| 4.1.1. Grupo controle . . . . .                | .19    |
| 4.1.2. Grupo laser . . . . .                   | .19    |
| 4.2. Microscópicos . . . . .                   | .21    |
| 4.2.1. Coloração Hematoxilina-eosina . . . . . | .21    |
| 4.2.2. Coloração Tricômio de Masson . . . . .  | .24    |
| 5. DISCUSSÃO . . . . .                         | .31    |
| 6. CONCLUSÃO . . . . .                         | .34    |
| 7. REFERÊNCIAS . . . . .                       | .35    |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.     | Imagem fotográfica do aparelho de laser de baixa intensidade HeNe - HTM 904. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 12     |
| 2.     | Imagem fotográfica dos procedimentos experimentais. A: Defeito cutâneo provocado; B: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% sobre a ferida criada; C: animal com a bandagem no pós-operatório imediato. ....                                                                                                                                                                                                                            | 15     |
| 3.     | Imagem fotográfica da técnica de enxerto cutâneo por sementeira. A: Leito receptor com tecido de granulação já formado; B e C: Abertura dos poços no leito receptor; D: Poços receptores abertos no tecido de granulação; E: Implantação dos enxertos de espessura total no leito receptor; F: Aspecto dos enxertos logo após a implantação no leito receptor; gr: Aplicação do laser de baixa intensidade no pós-operatório imediato. .  | 16     |
| 4.     | Imagem fotográfica da aplicação do laser de baixa intensidade sobre as áreas dos enxertos. A: No pós-operatório imediato; B: No sétimo dia de pós-operatório. ....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 17     |
| 5.     | Imagens mostrando a evolução da ferida macroscopicamente. Nas imagens, as letras referem-se aos tempos: A: 1 dia após a realização do enxerto; B: 2 dias; C: 4 dias; D: 8 dias; E: 14 dias. Os números indicam os grupos: 1 grupo ctrl; 2 grupo laser. Os símbolos inseridos nas imagens significam respectivamente: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; S, secreção; Seta: área reepitelizada; *, zonas de retração cicatricial. .... | 20     |
| 6.     | Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração HE, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: círculo: infiltrado inflamatório; seta grossa: epitélio; ....                                                                                                                                                                                                         | 22     |
| 7.     | Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração HE, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: seta grossa: epitélio; seta fina: papilas dérmicas; seta vermelha: crista epidérmica. ....                                                                                                                                                                            | 23     |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.  | Imagens fotográficas dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração Tricômio de Masson, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; seta grossa: epitélio; e as setas finas apontam a camada de queratina. ....                                                          | 25 |
| 9.  | Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração Tricômio de Masson, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; seta grossa, epitélio; e as setas finas apontam a camada de queratina. ...                                                               | 26 |
| 10. | Fotomicrografias dos cortes histológicos corados com Tricômio de Masson evidenciando alguns vasos sanguíneos (setas) na região intermediária entre o enxerto e o leito receptor. Nas imagens, as letras referem-se aos tempos: A: 1 dia após a realização do enxerto; B: 2 dias; C: 4 dias; D: 8 dias; E: 14 dias. Os números indicam os grupos: 1 ctrl; 2 laser. . | 28 |
| 11. | Fotomicrografias do corte histológico da região de enxerto por sementeira de um animal do grupo controle sacrificado com 2 dias corado com hematoxilina e eosina. A: aumento de 40X, B: aumento de 100X. As letras inseridas na imagem significam: ex: o enxerto necrosado, gr identifica o tecido de granulação do leito receptor. ....                            | 30 |
| 12. | Imagem fotográfica do corte histológico do enxerto por sementeira de um animal do grupo controle , com 2 dias corado com Tricômio de Masson. A: aumento de 40X, a B de 100X. As letras inseridas na imagem significam: ex: a região do enxerto necrosado, gr: o tecido de granulação. ....                                                                          | 30 |

## LISTA DE TABELAS

| <b>Tabela</b> |                                                                                                                                                                                             | <b>Página</b> |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1.</b>     | Análise qualitativa dos cortes histológicos em cada tempo, e tratamento, em relação a quantidade de infiltrado inflamatório, presença de epitélio e queratina.FCAV/UNESP/JABOTICABAL, 2009. | 27            |
| <b>2.</b>     | Valores das médias da contagem do número de vasos em cada tempo e tratamento FCAV/UNESP/JABOTICABAL, 2009.                                                                                  | 29            |

## **ANÁLISES MACRO E MICROSCÓPICA DE ENXERTOS CUTÂNEOS POR SEMEADURA APÓS LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE.**

**RESUMO:** Os enxertos de pele são uma alternativa para o fechamento de lesões extensas onde a reaproximação dos bordos da ferida não é possível. A incorporação do enxerto no leito receptor depende de conexões arteriais e venosas dessas duas partes. Baseando-se em trabalhos em que a laserterapia de baixa intensidade acelera o processo de cicatrização e favorece angiogênese e, com intenção de se obter melhor resultado em enxertos cutâneos por semeadura, optou-se pela aplicação do laser HeNe. Dessa forma 20 ratos foram submetidos a esta técnica de enxertia e separados em dois grupos iguais, um tratado com laser e outro não (controle). Os resultados mostraram maior velocidade de cicatrização, menor tempo de reação inflamatória, maior número de vasos sanguíneos, epitelização e queratinização precoces nos animais tratados com laser em relação aos não tratados, sugerindo então que a laserterapia de baixa intensidade é efetiva para o uso em enxertos por semeadura.

**Palavras chave:** Cirurgia, Anaplastia, Cicatrização, Laser, Ratos

## **MACRO AND MICROSCOPIC ANALYSIS OF ISLAND SKIN GRAFTS AFTER LOW-LEVEL LASER THERAPY**

**ABSTRACT:** Skin grafts are the alternative to close big lesions, when the borders approach are difficult or impossible. The graft incorporation on receptor site depends of blood vessels conection. Based on literature that low-level laser therapy acceletares the cicatricial process and favors the angiogenesis, HeNe laser was applied to accelerate the cicatricial process on island skin grafts. For this, 20 rats were submitted to this graft technique and divided in two groups with the same number of animals, one called laser and other called control. The results show faster cicatrization, short inflammatory period, larger number of blood vessels and precocious epitelization and queratinization on he laser group. These facts suggest that low-level laser therapy is effective and helps island skin grafts cicatrization.

**Key-words:** Surgery, Anaplasty, Cicatrization, Laser, Rats.

## **1 INTRODUÇÃO**

Os enxertos de pele são uma alternativa para o fechamento de lesões extensas onde a reaproximação dos bordos não é possível. O enxerto se torna efetivo quando o transplante cicatriza na sua nova localização, o que depende de conexões arteriais e venosas com o leito receptor, processo chamado inosculação. Este processo, no entanto, ocorre entre 22 e 72 horas após a realização da técnica de enxertia, e neste período crítico, qualquer manipulação ou movimento da ferida pode causar a ruptura desses novos vasos e levar ao insucesso da técnica. Na intenção de obter-se melhor resultado, com relação ao processo de cicatrização, optou-se pela aplicação do laser de baixa intensidade HeNe para sua aceleração pelo favorecimento da angiogênese e da rápida epitelização, resultados já comprovados neste tipo de tratamento. Com base em todos estes resultados, foi proposto com este trabalho estudar os efeitos da laserterapia de baixa intensidade em enxertos cutâneos por sementeira, observando o comportamento da neovascularização, a velocidade e facilidade da incorporação dos enxertos em seu leito receptor e a cicatrização da ferida enxertada.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Enxerto Cutâneo**

O enxerto de pele consiste na transferência, para leito receptor, de porção de epiderme e derme completamente destacada do local doador. Em cães e gatos eles são indicados especialmente no tratamento de feridas extensas, nas quais os retalhos cutâneos não podem ser aplicados devido à localização, tipo ou extensão da lesão (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).

Os enxertos cutâneos podem ser classificados em função da relação hospedeiro-doador, da fonte, da forma e da espessura (PAVLETIC et al., 1986; PAVLETIC, 1993 e 1998; POPE, 1988; SWAIN, 1990). Auto-enxerto é aquele transferido do local doador para o leito receptor num mesmo animal. Aloenxerto ou homoenxerto é usado entre animais de uma mesma espécie e xenoenxerto ou heteroenxerto é realizado entre indivíduos de espécies diferentes. Os auto-enxertos apresentam maior êxito, uma vez que, o enxerto e o hospedeiro são imunologicamente idênticos (POPE, 1988).

Quanto à espessura, podem ser classificados em totais ou parciais. Os primeiros são compostos pela derme e epiderme completa e precisam de um leito com excelente vascularização. Já os parciais, com apenas a epiderme e parte da derme podem ser aplicados em leitos com vascularização questionável ou em grandes defeitos cutâneos (PAVLETIC et al., 1986; POPE, 1988).

Os principais fatores responsáveis pelo dano ao enxerto são mobilidade, contato inadequado, formação de hematomas ou seromas abaixo da pele e infecções bacterianas. O contato impróprio entre o enxerto e o leito receptor impede a interdigitação das superfícies, resultando em pobre revascularização. A imobilização também é necessária para que não se rompa o selo de fibrina, o que interferiria na inosculação e no crescimento de capilares. Os seromas ou hematomas afastam o enxerto do leito receptor o que atrasa a revascularização. A infecção bacteriana é nociva porque causa dissolução do selo de fibrina e produz exsudato que eleva o enxerto do leito receptor (POPE, 1988; SWAIN, 1998). Portanto uma técnica asséptica é de fundamental importância para o sucesso do enxerto (PAVLETIC, 1993).



Nas primeiras 48 horas o enxerto sobrevive da absorção dos fluidos dos leitos capilares. Durante este período os capilares do leito receptor se unem aos do enxerto para restabelecer a circulação vital. Se a circulação for adequada, o enxerto adquire coloração rosada em 48 horas. Enxertos com obstrução circulatória, apresentam coloração cianótica (PAVLETIC, 1993).

## **2.2 Enxertos por Semeadura**

Swain (1998) os define como pequenos e circulares que são inseridos em bolsos criados num tecido granulado para formar ilhas epitelizadas. É uma técnica que alcança bastante sucesso, mas seu resultado esteticamente não é bom, pois a ferida fica recoberta somente por epitélio. São indicados para aplicação em feridas com processo de granulação, pequenas feridas em membros, feridas contaminadas ou com infecção de baixa intensidade ou ainda com o contorno irregular.

Após a escolha do leito doador e prévia tricotomia, os enxertos são coletados com um *punch* ou uma lâmina de bisturi (SWAIN, 1998) posicionado de forma paralela ao sentido dos pêlos. A gordura subcutânea é retirada deles e antes de colocá-los em recipiente com solução salina estéril, quando então é aplicada a sutura nos sítios de doação. O leito receptor com tecido de granulação é perfurado com *punch* de menor diâmetro e em cada orifício é feita hemostasia com auxílio de uma haste de algodão estéril. Segue-se então a acomodação dos enxertos nos bolsos criados. A área deve receber um curativo e ser imobilizada por três a cinco dias. A retirada precoce da bandagem pode ser prejudicial, pois pode movimentar o enxerto nas primeiras 48 horas que é o período crítico de revascularização (PAVLETIC, 1993; SWAIN, 1998).

Swain (1998) destaca como vantagens a não obrigatoriedade do uso de instrumentos especiais, a revascularização satisfatória e a epitelação facilitada pela livre migração das células a partir da margem do enxerto que se encontra nivelado ao tecido de granulação. Como desvantagens, relata o excessivo sangramento que pode expulsar o enxerto do leito receptor e retardar a revascularização, o aspecto pouco estético pela ausência de pêlos e a fragilidade do novo epitélio.

### 2.3 Biomembrana Natural de Látex

A membrana foi desenvolvida em 1994 quando se pensou em construir uma prótese esofágica com látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). A prótese foi então desenvolvida e implantada para substituir um fragmento de oito centímetros do esôfago em oito cães. Dez dias após o implante, a região substituída havia se reconstituído. Histologicamente, o tecido neoformado era muito semelhante ao do esôfago normal, com todas as camadas (ERENO, 2005). Não havia praticamente nenhuma cicatriz e nem formação de fibrose no local reparado, sugerindo processo de neoformação tecidual (MRUÉ, 1996).

Testes comparativos feitos com a membrana, luvas cirúrgicas e preservativos em ovos embrionados e orelhas de coelhos comprovaram a diferença de manifestação das propriedades angiogênicas e cicatrizante entre a membrana e os outros produtos derivados do látex (PELE NOVA, 1999). Ela também se mostrou mais eficiente do que a tela de marlex (MRUÉ, 2000).

A membrana é fina, elástica e de fácil manuseio, possui fina camada de polilisina que aumenta a permeabilidade e o fluxo microvascular (PINHO et al., 2004). Tem ainda comprovada biocompatibilidade e baixo custo em comparação com as outras alternativas encontradas no mercado (MRUÉ, 1996 e 2000; PELE NOVA, 1999; POTÉRIO-FILHO et al., 1999; FRADE et al., 2001, 2002 e 2003). Sua microarquitetura particular permite aderência proteica e celular, especialmente os macrófagos relacionados ao processo de reparação tecidual (MRUÉ, 1996 e 2001; THOMAZZINI et al., 1997).

Pacientes com úlceras crônicas de pele de difícil cicatrização mostraram sinais de granulação e epitelização no período médio de 12 dias de curativos com a membrana (ERENO, 2005). Também foi usada na reconstituição de tímpanos em humanos (OLIVEIRA et al., 1998), na cicatrização de conjuntiva e esclera (PINHO et al., 2004; TALIERI, 2004) e palatoplastias em cães (SILVA, 2006).

Sader et al. (2000), substituíram parte do pericárdio de cães pela biomembrana e constatou a regeneração tecidual do mesmo. Posteriormente, Freitas (2001) obteve sucesso em arterioplastias em cães.

## 2.4 Laser e Cicatrização

De acordo com Low e Reed (2001), o termo laser vem da abreviação *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*. É um feixe de radiação que difere da luz comum por possuir monocromaticidade, coerência e colimação. O primeiro se refere a um comprimento de onda específico e único com frequência definida, o segundo a picos e depressões eletromagnéticas ocorrem ao mesmo tempo e o terceiro a não divergência da radiação.

Como todos os tipos de radiação, o laser pode ser refletido da superfície, penetrar nos tecidos dependendo do comprimento de onda, da natureza da superfície e do ângulo de incidência. Após entrar no tecido, a radiação laser é espalhada por divergência, reflexão e refração. Ela ainda é atenuada por absorção e existem duas áreas principais nas quais a laserterapia é usada: cicatrização dos tecidos e controle da dor (LOW & REED, 2001). Entre essas amplas categorias, é largamente utilizada no tratamento de todos os tipos de lesão em tecidos moles.

A aplicação de radiações de todos os tipos para acelerar a cicatrização de feridas tem uma longa história, mas as da parte vermelha do espectro visível são bastante eficazes. Low e Reed (2001) comprovaram que comprimentos de onda de 660, 820, e 870nm fazem com que os macrófagos liberem mediadores químicos que estimulam a proliferação de fibroblastos acima dos níveis de controle, enquanto que a onda de 880nm causa inibição. Sugeriram também que a frequência de pulso de 16 Hz é efetiva para a cicatrização dos tecidos. Fatores adicionais na aceleração da cicatrização de feridas com laser podem incluir aumento acentuado na formação de colágeno, vasodilatação, síntese de DNA e aumento na produção de RNA.

Em 2004, Nascimento et al. testaram diferentes relações entre comprimentos de onda e intensidade da Laserterapia de Baixa Intensidade (LTBI) na cicatrização de feridas, e relataram que seu melhor efeito se dá com a relação inversamente proporcional entre o comprimento de onda e a intensidade. Assim sendo, o tratamento mais efetivo ocorria combinando-se alta intensidade e comprimento de onda curto ou vice-versa.

Alguns anos depois, Hawkins e Abrahamse (2006) mostraram que doses e exposições adequadas em intervalos de tempo corretos são fatores decisivos no tratamento de feridas e aceleram seu fechamento. A laserterapia bem ajustada promove cicatrização das feridas por estimular migração celular, atividade mitocondrial e proliferação fibroblástica, mantendo a viabilidade sem causar danos ou estresse celular.

Os efeitos terapêuticos da LTBI foram constatados em estudos *in vitro* e *in vivo* e incluíram regeneração, efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. Em outros estudos observaram-se ganhos na microcirculação local (MAIER et al., 1993), sistema linfático (REEDY et al., 1998) e síntese de colágeno pelos fibroblastos (CARVALHO et al., 2003; REEDY et al., 1998) e na prevenção de infecções (KARU, 2004 e WALKER, 2000 citados por NASCIMENTO et al., 2004).

A LTBI foi utilizada para acelerar processos regenerativos, sendo-lhe atribuído o aumento no fluxo sanguíneo, ação anti-edematosa, analgésica e estimulante do metabolismo celular (RE & VITERBO, 1985 citados por MAZZANTI et al., 2004). Dessa forma muitos experimentos são desenvolvidos com animais para testar a efetividade da laserterapia para futuramente se instituir esse protocolo terapêutico no tratamento em seres humanos.

Posten et al. (2005) descreveram os mecanismos e a eficácia da LTBI na cicatrização de feridas e concluíram que embora os mecanismos ainda não estejam totalmente esclarecidos, houve aumento na proliferação de vários tipos de células da pele (fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos). Também relatam a necessidade de mais estudos para melhor caracterizar a ação do laser em tecidos vivos.

Um estudo experimental de Pugliese et al. (2003), sugere que a terapia a laser modula a expressão do colágeno e fibras elásticas *in vivo*, além de promover maior organização das bandas colágenas nos animais irradiados em relação aos controles.

Aumento na neovascularização, na proliferação fibroblástica e diminuição do infiltrado inflamatório em lesões cirúrgicas submetidas à terapia com laser, já foram evidenciados, indicando que esta é eficaz e contribui significativamente para a cicatrização tecidual mais rápida e organizada (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Araújo et al. (2007), mostraram que a LTBI acelera a cicatrização de feridas porque estimula atividades biológicas e diferenciação dos fibroblastos, redução do processo inflamatório e ainda contribui para a organização das fibras colágenas no compartimento extracelular.

Chen et al. (2008) observaram *in vitro* que todos os fibroblastos irradiados apresentaram melhor propriedade de proliferação do que o grupo controle. Com a LTBI os fibroblastos aumentaram a expressão de RNAm para a produção de colágeno do tipo I, isso porque o laser induziu aumento na produção de fatores de crescimento celular. Visto que a aceleração da cicatrização se dá por proliferação fibroblástica e produção de matriz extracelular, a expressão de RNAm para colágeno do tipo I e decorina é um efeito positivo da proliferação celular e portanto reforça, o potencial terapêutico da LTBI para tratamento de lesões no tendão de Aquiles.

Tanto o ultrassom pulsado (US) assim como a LTBI são utilizados na cicatrização de feridas, por este motivo, essas duas técnicas foram comparadas por Oliveira et al. (2008). Eles observaram que o laser promove produção de matriz extracelular e aumento na produção de colágeno resultando em maior resistência na contração cicatricial do que as feridas tratadas com US, sendo então mais eficaz na reparação tecidual por acelerar a primeira e segunda fase da cicatrização.

Em relação à ação anti-inflamatória da laserterapia, Viegas et al. (2007) confirmaram a hipótese de que a LTBI promove rápida iniciação e resolução da fase inflamatória da reparação tecidual, tornando-a mais aguda e severa e aumentando a síntese de colágeno. Entretanto, não comprovaram a ação anti-inflamatória do laser mas verificaram que ele acelera esse processo e também promove qualidade histológica ao tecido reparado.

Quanto à proliferação vascular, a LTBI promove alterações instantâneas na microcirculação sanguínea local, mas estímulos à angiogênese durante o processo de cicatrização podem ocorrer, isto pode ser constatado pelo aumento de vasos sanguíneos locais em grupos irradiados no sétimo dia após a lesão (NUÑES et al., 2004).

Entre os efeitos da LTBI, há evidências de que estes atuam de maneira local e sistêmica, pois, no relato de Lucas e colaboradores (2002), os resultados obtidos em feridas provocadas bilateralmente, onde somente um

dos lados foi irradiado por laser, não apresentaram diferenças significativas na cicatrização quando comparados entre si. O lado irradiado e o não irradiado sofreram cicatrização em menor tempo, enquanto as feridas no grupo controle apresentaram gangrena e necrose sugerindo o efeito sistêmico da LTBI. Damante et al. (2004), não obtiveram diferenças significativas na cicatrização de gengivoplastias com e sem irradiação a laser, pois o controle usado foi a arcada contralateral do mesmo paciente.

Com esses dados sobre laserterapia e cicatrização da pele, este tratamento passou a ser testado em outros tecidos. Na reparação tendínea de coelhos, os resultados apresentados após o tratamento com laser, como organização, alinhamento e as conexões do colágeno sintetizado são favoráveis histológica e biomecanicamente na cicatrização (ARRUDA et al, 2007; ELWAKIL, 2007).

Matera et al. (2003) utilizaram a LTBI após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães e obtiveram uma rápida recuperação pós-operatória com retorno mais rápido à função do membro, ao contrário dos animais que não receberam a irradiação do laser.

A aplicação de LTBI no tecido ósseo tem se voltado a estudar os benefícios na recuperação de fraturas e osteointegração de implantes. Em análises feitas por Khadra et al. (2004) sobre testes de tensão, avaliação histomorfométrica e microanálise por dispersão de raios-X verificou-se que ela apresentou efeitos positivos na osteointegração de implantes de titânio. A deposição de cálcio e fósforo foi maior no grupo irradiado e segundo os autores este fato torna o tratamento promissor para acelerar a osteointegração do implante. Já Nissan et al. (2006), relataram que a LTBI estimulou a mineralização no processo de formação óssea em defeitos criados cirurgicamente, mas não influenciou a atividade dos osteoblastos no processo de formação de osso em osteotomias para implantes.

O tratamento de feridas, principalmente infecciosas, pode ser longo e doloroso para os pacientes. Foi proposto a laserterapia com HeNe no tratamento de feridas Paracoccidiodomicóticas experimentais que revelou eficiência em diminuir efeitos locais, causados pelo fungo *P. brasiliensis*, além de ser capaz de provocar mudanças na dinâmica da fase inflamatória e proliferativa do processo de reparação tecidual. Assim sendo, pode ser

considerado uma boa terapia para este tipo de lesão pois acelera a cicatrização e diminui o desconforto e a dor do paciente (FERREIRA et al, 2009). Enwemwka et al. (2004) já haviam afirmado que a laserterapia é uma modalidade altamente efetiva na reparação tecidual e no controle da dor.

Cicatrização é um processo complexo que vem atraindo a atenção de pesquisadores ao longo dos anos, particularmente em relação a fatores que possam interferir no seu curso. Os eventos mais importantes do reparo ocorrem nos estágios iniciais, e são representados por edema, redução da proliferação vascular e diminuição da quantidade de células como leucócitos, macrófagos e fibroblastos (CARVALHO et al., 2003). Algumas doenças sistêmicas podem interferir no processo de cicatrização de lesões, entre elas a mais comum é o diabetes mellitus. Num estudo com animais diabéticos, o grupo irradiado com laser de baixa intensidade apresentou aumento nos níveis de hidroxiprolina, proliferação fibroblástica e capilar, vascularização, formação de tecido de granulação e epitelização, facilitando a cicatrização das feridas (ARUN MAIYA et al., 2005).

Carvalho et al. (2006) induziram o diabetes mellitus em ratos que tiveram lesões provocadas cirurgicamente e foram tratados com a LTBI. Os resultados mostraram nos animais tratados maior número de fibras colágenas em relação ao grupo não tratado.

O uso de corticosteróides é outro fator que tem grande interferência no processo cicatricial. Pacientes que necessitam fazer uso prolongado deste tipo de medicamento são prejudicados por apresentarem maior tempo para a cicatrização de feridas. Segundo Pessoa et al. (2004), a LTBI se mostrou capaz de promover diminuição do infiltrado inflamatório, grande diferenciação epitelial, maior deposição de colágeno e diminuição no tempo de cicatrização causada pelo uso de corticosteróides, e, concluíram que o laser é uma opção para otimizar a cicatrização de feridas de pacientes que fazem uso desse tipo de medicamento.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV/UNESP/JABOTICABAL.

Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos jovens com idade média de 20 dias, com peso médio variando entre 200 e 300g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Centro - Oeste, Guarapuava - Paraná (UNICENTRO- PR).

Os animais foram mantidos em uma sala nas dependências da Clínica Escola Veterinária (CEVET) da mesma instituição que possuía uma bancada com pia, iluminação elétrica e um aquecedor portátil. Sua temperatura era controlada e estabilizada em torno de 25°C. Os ratos permaneceram em grupos de cinco em caixas de polipropileno, providas de cama de maravalha selecionada, mamadeira para água, cocho para ração peletizada, recebendo água e ração *ad libitum*, condições de manutenção de acordo com os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos iguais (n=10), um controle (GC), que não recebeu a LTBI e outro laser (GL), que recebeu aplicações de laser sobre as feridas. Todos os animais (n=20) receberam curativos com a biomembrana após a criação da ferida, na primeira etapa do experimento.



### 3.2 Aparelho de Laser de Baixa Intensidade

O aparelho utilizado foi o HTM 904 (Figura 1) que foi gentilmente cedido pela Clínica Escola de Fisioterapia da UNICENTRO/Guarapuava. Este irradia o laser HeNe com frequência pulsada, comprimento de onda de 904nm e potência média de 0,2 W. O efeito desejado depende da densidade de energia irradiada no tecido. Para ação regenerativa, esta se encontra na faixa entre 3 e 6 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Imagem fotográfica do aparelho de laser de baixa intensidade HeNe – HTM 904.

### **3.3 Procedimento experimental**

#### **3.3.1 Preparação do leito receptor**

Os animais dos dois grupos (n=20) foram submetidos à cirurgia com o propósito de criação de um defeito na pele. Para isso os animais foram submetidos a anestesia inalatória com Isoflurano<sup>1</sup> em máscara. Em seguida, foi feita a raspagem do pêlos do lado direito do corpo sobre as costelas e a antisepsia foi realizada com solução de Iodo Povidine. A ferida foi criada com o auxílio de bisturi e tesoura e tinha dimensão de aproximadamente 4X4 cm (Figura 2A). A biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% foi utilizada em todos os animais como curativo sobre a ferida, sem fixação com sutura, para favorecer a granulação rápida e satisfatória (Figura 2B). Bandagens protetoras com faixa de crepe e esparadrapo (Figura 2C) também foram aplicadas. Após cinco dias os curativos foram trocados, a membrana foi lavada em água corrente e reposicionada novamente sobre a lesão.

No pós operatório imediato foi administrado por via intramuscular em dose única 0,02mL de enrofloxacin 10%<sup>2</sup> e 0,02 mL de flunexin meglumine<sup>3</sup>.

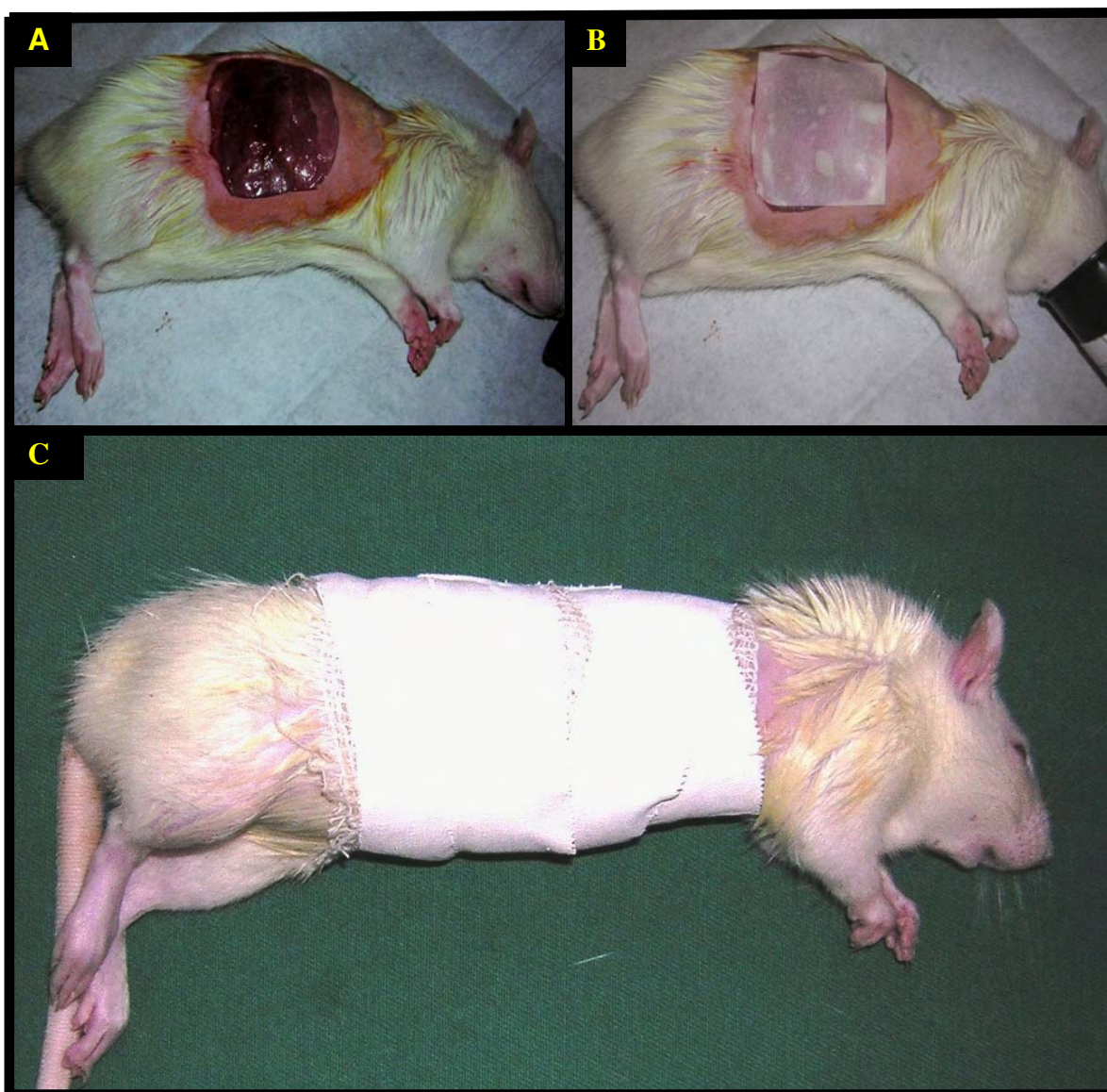
Diariamente os animais foram observados quanto ao seu comportamento e alimentação.

---

<sup>1</sup> Isoforine - cristália

<sup>2</sup> Iflox 10% - Irfa

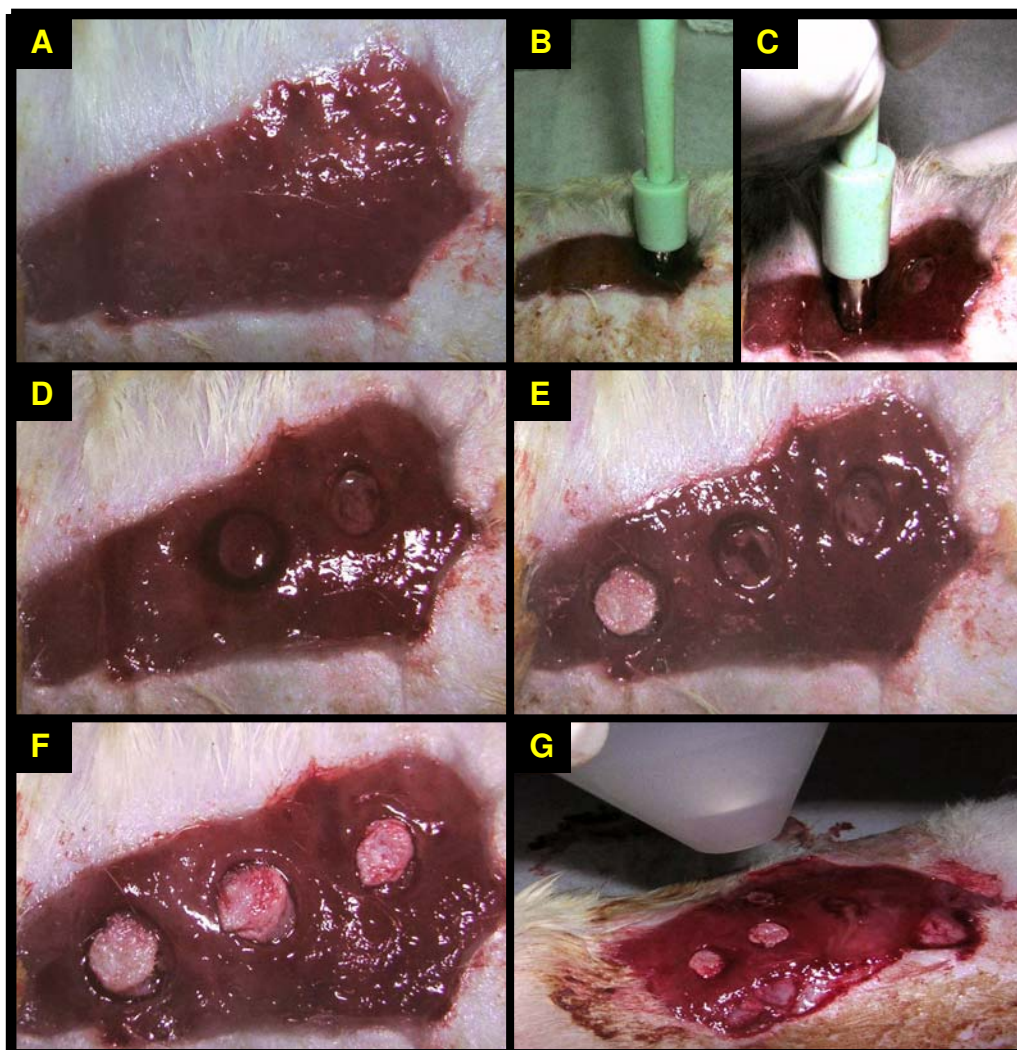
<sup>3</sup> Flumedin - Jofadel



**Figura 2.** Imagem fotográfica dos procedimentos experimentais. A: Defeito cutâneo induzido; B: Biomembrana de látex com polilisina 0,1% sobre a ferida criada; C: animal com a bandagem no pós-operatório.

### 3.3.2 Realização dos enxertos

Após 10 dias, em novo procedimento cirúrgico, todos os animais receberam os enxertos, também sob anestesia inalatória com isofluorano. O flanco esquerdo sofreu tricotomia com lâmina para ser o sítio doador e realizou-se antissepsia com solução de iodo povidine. Os enxertos de espessura total foram colhidos com um *punch* cirúrgico de 5mm de diâmetro e colocados num recipiente com solução fisiológica estéril. Os sítios doadores cicatrizaram por segunda intenção. O animal foi, então, reposicionado em decúbito lateral esquerdo, com o sítio receptor, já devidamente granulado, para cima (Figura 3A). Com um *punch* de 4mm de diâmetro (Figura 3B e C), foram feitos poços no tecido de granulação (Figura 3D) para a acomodação do enxerto (Figura 3E e F). Logo após o procedimento cirúrgico, os ratos do GL receberam a primeira aplicação do laser (Figura 3G).



**Figura 3.** Imagem fotográfica da técnica de enxerto cutâneo por sementeira. **A:** Leito receptor com tecido de granulação já formado; **B e C:** Abertura dos poços no leito receptor **D:** Poços receptores abertos no tecido de granulação; **E:** Implantação dos enxertos de espessura total no leito receptor; **F:** Aspecto dos enxertos logo após a implantação no leito receptor; **G:** Aplicação do laser de baixa intensidade no pós-operatório imediato no GL.



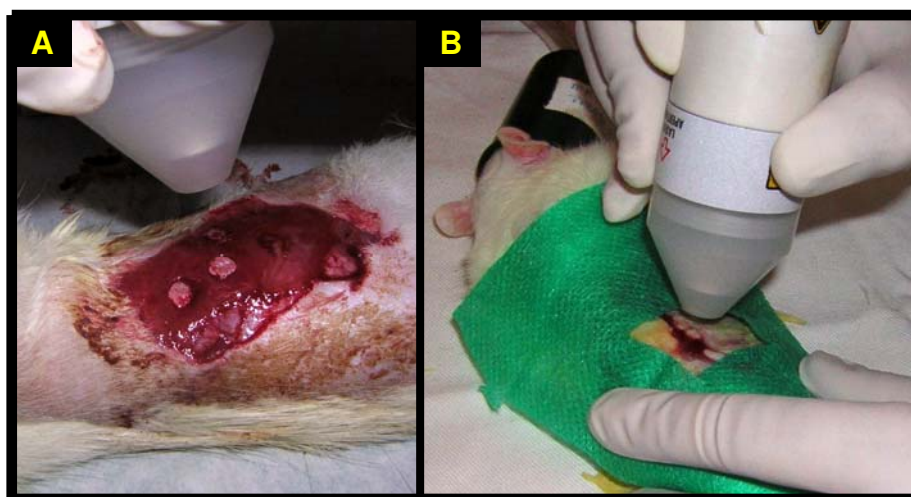
O laser escolhido para este estudo foi o HeNe, aparelho HTM 904. Para a sua aplicação foi necessário definir algumas variáveis e calcular o tempo de aplicação.

Entre as variáveis está a densidade de potência, grandeza que expressa a dosagem do laser e é função exclusiva do efeito que se deseja obter. No presente trabalho onde o objetivo foi ação regenerativa usou-se  $6 \text{ J/cm}^2$  /18 segundos.

O GL (n=10) recebeu no pós-operatório imediato, 3 dias depois e no sétimo dia, irradiação com laser de baixa intensidade (Figura 4) por 18 segundos em cada ponto enxertado. Durante a aplicação, a caneta laser era posicionada com um punho de distância para que a interface entre o enxerto e o leito receptor fossem irradiados.

O GC (n=10) não recebeu a LTBI, porém todos os animais (n=20) receberam bandagem de proteção e medicação por via intramuscular em dose única, 0,02mL de enrofloxacina 10% e 0,02mL de flunexin meglumine, logo após o término do procedimento cirúrgico.

Nas datas definidas para aplicações do laser de baixa intensidade no GL, também foram feitas as trocas das bandagens protetoras do GC.



**Figura 4.** Imagem fotográfica da aplicação do laser de baixa intensidade sobre as áreas dos enxertos. A: No pós-operatório imediato; B: No sétimo dia de pós-operatório.

Dois animais de cada grupo (GC e GL) foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> nos tempos um, dois, quatro, oito e 14 dias após a segunda intervenção cirúrgica.

Logo após o sacrifício, foram colhidas amostras que abrangiam os enxertos e parte do tecido adjacente (leito receptor). De cada animal colheu-se três amostras correspondentes ao número de enxertos realizados. Estas eram identificadas e conservadas em solução de formol a 10%.

### **3.4 Histologia**

O material conservado foi processado em laboratório e incluído em parafina conforme os métodos histológicos de rotina. No preparo das lâminas foram feitos cortes transversais de 5µm de espessura em um micrótomo manual Leica RM 2125RT, Germany. Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina e pelo Tricômio de Masson.

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em aumentos de 40X, 100X no microscópio óptico Olympus BX 250 acoplado a uma câmera Olympus DP71. As imagens foram transferidas para um computador e processadas pelo programa DP Controller Olympus 2002-2007 da Olympus Corporation.

Para a contagem de vasos sanguíneos foram fotomicrografados quatro campos aleatórios na interface enxerto-leito-receptor num aumento de 400X. Os vasos de cada imagem foram contados e compilados em tabela. A média de cada tempo para cada tratamento (controle e laser) foi analisada estatisticamente pelo Teste de Tukey pelo programa SAS – System (2004)<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> SAS Institute Inc. SAS Online Doc®9.1.3. SAS/STAT Cary, N.C., 2004

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Macroscópicos**

#### **4.1.1 Grupo Controle:**

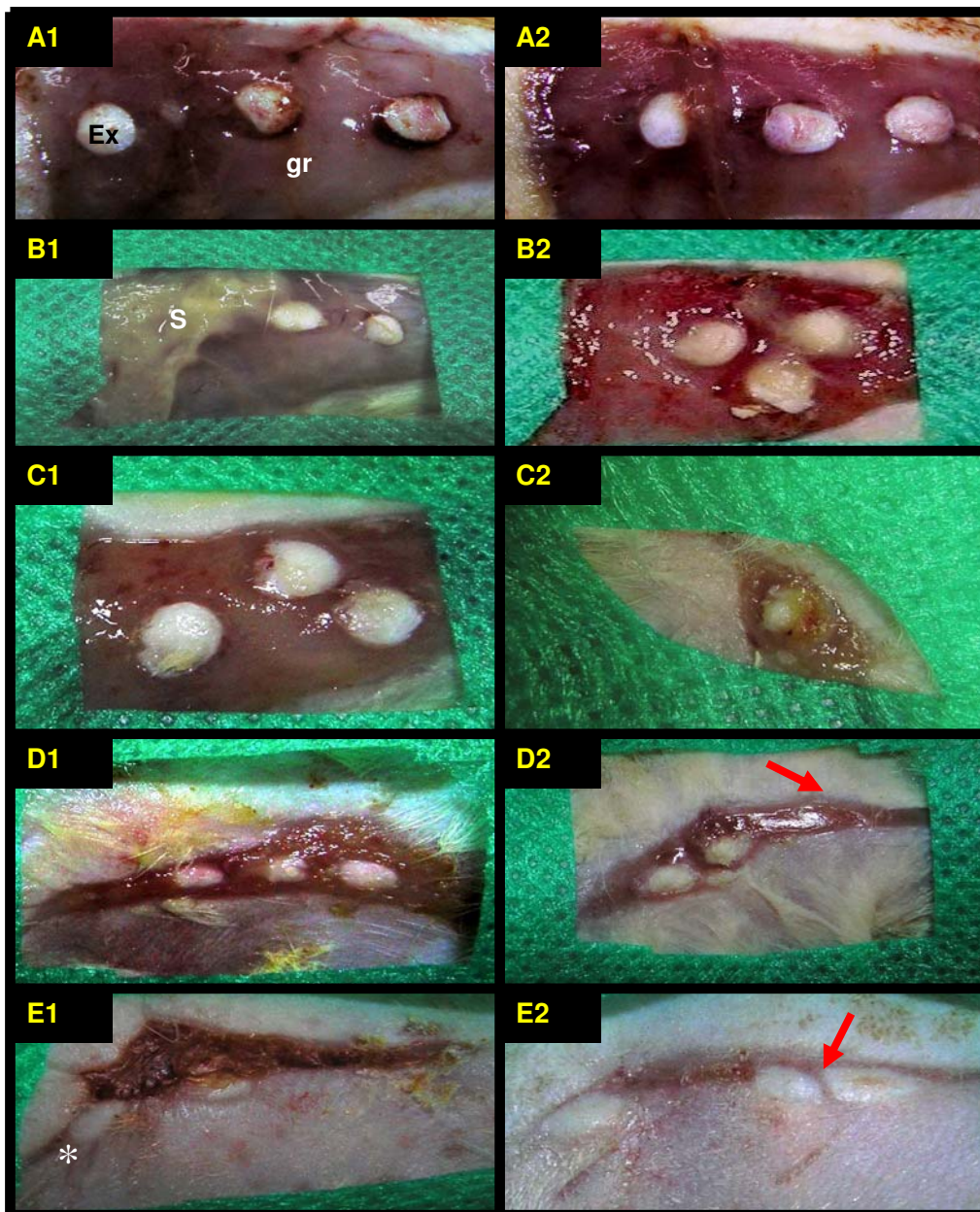
Um dia após o segundo procedimento cirúrgico e a primeira aplicação do laser de baixa intensidade, a ferida estava com aspecto hemorrágico, principalmente ao redor dos sítios receptores dos enxertos (Figura 5 A1). No segundo dia, houve diminuição da hemorragia mas havia edema e secreção amarelada recobrando todo o local (Figura 5 B1). No quarto dia, o tecido de granulação estava mais pálido. O leito receptor estava com menor área e sinais de retração cicatricial nas laterais da ferida, fazendo com que os enxertos se aproximassem das bordas (Figura 5 C1). Oito dias após o procedimento cirúrgico, o tecido de granulação se encontrava bem avermelhado, com menor área e aspecto ressecado na sua superfície. Os sítios receptores já estavam margeando as bordas (Figura 5 D1). Por fim, aos 14 dias, uma crosta ressecada recobria toda a ferida. Os enxertos estavam praticamente envolvidos pela pele íntegra e sinais de retração cicatricial e epitelização nas bordas estavam presentes (Figura 5 E1).

#### **4.1.2 Grupo Laser**

No primeiro dia de pós-operatório, a ferida tinha aspecto hemorrágico, embora visualmente em menor intensidade que a do grupo controle (Figura 5 A2). Após 2 dias, o tecido de granulação avermelhado apresentava pequenas petéquias hemorrágicas (Figura 5 B2). Com três dias, a área do leito receptor estava menor, mais pálida e com secreção serosa (Figura 5 C2). No oitavo dia, iniciou-se a epitelização das bordas e, embora diminuída, a ferida não tinha sinais de retração cicatricial (Figura 5 D2). Aos 14 dias, a cicatrização estava quase completa. Os enxertos estavam circundados pelo tecido reepitelizado e pela pele íntegra adjacente à ferida. Apenas uma pequena área no centro do leito receptor não tinha aspecto epitelizado (Figura 5 E2).

Em ambos os grupos, não houve deslocamento do enxerto de seu sítio receptor, fato importante para o sucesso da técnica.





**Figura 5.** Imagens fotográficas mostrando a evolução da ferida macroscopicamente. Nas imagens, as letras referem-se aos tempos: A: 1 dia após a realização do enxerto; B: 2 dias; C: 4 dias; D: 8 dias; E: 14 dias. Os números indicam os grupos: 1 grupo ctrl; 2 grupo laser. Os símbolos inseridos nas imagens significam respectivamente: ex - enxerto; gr - tecido de granulação; S - secreção; Seta vermelha - área reepitelizada; (\*) - zonas de retração cicatricial.

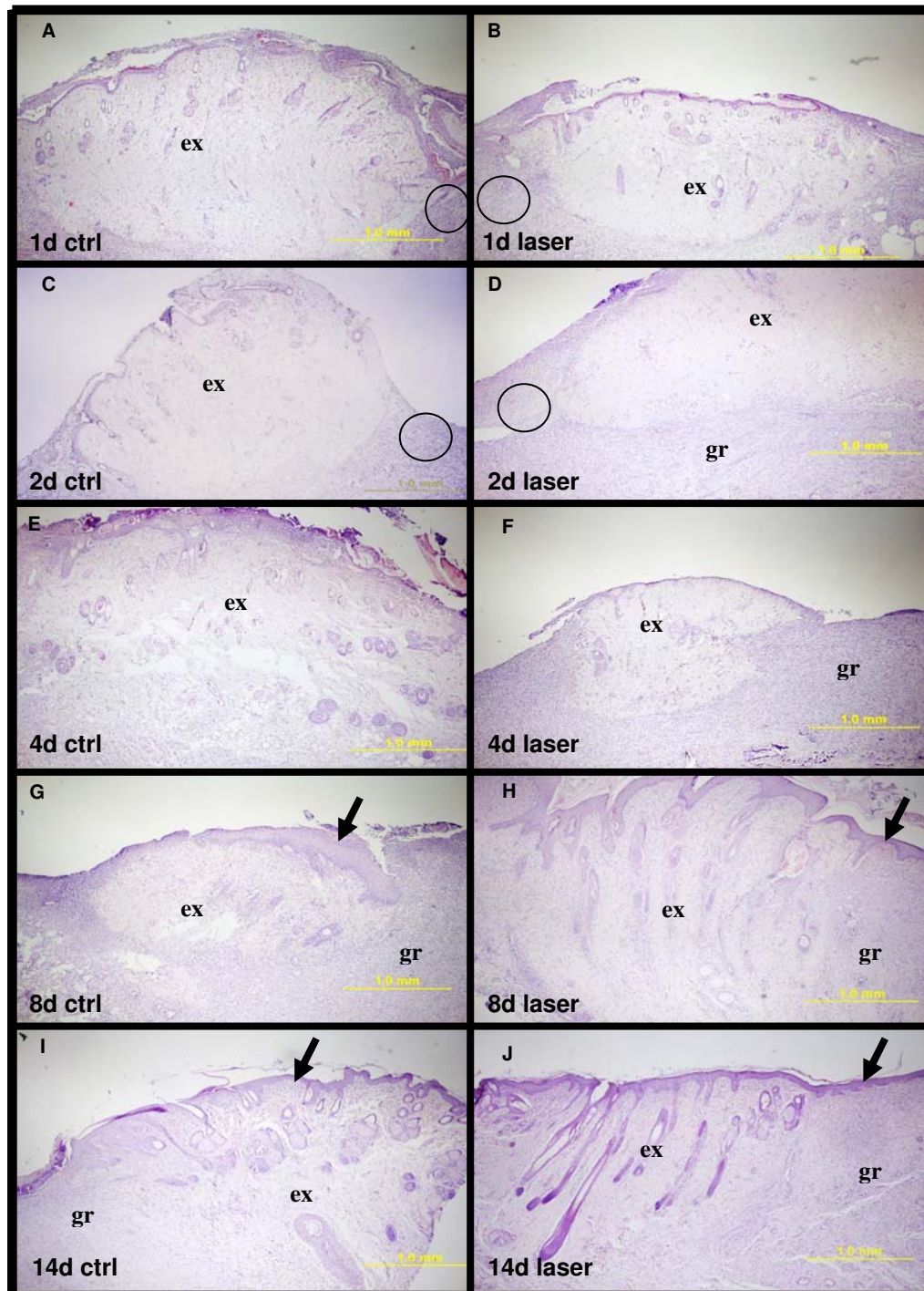
## **4.2 Microscópico**

### **4.2.1. Coloração hematoxilina eosina**

Na Figura 6 com aumento de 40X, é possível observar a região do enxerto e seu leito receptor formado pelo tecido de granulação. Nos tempos um e dois dias pode-se observar presença de infiltrado inflamatório que tem aspecto mais intenso no grupo controle. No quarto dia não há infiltrado inflamatório no grupo laser, e no grupo controle este já está atenuado. Com 8 dias, nota-se uma cobertura de epitélio somente na região do enxerto do grupo controle; já no grupo laser esse epitélio se estende da região do enxerto e sobre o tecido de granulação. Aos 14 dias, o grupo controle apresenta epitélio somente sobre o enxerto e no grupo laser, o epitélio que recobre o tecido de granulação apresenta estruturas chamadas papilas dérmicas que conferem maior aderência deste tecido e mostra maior grau de organização do mesmo.

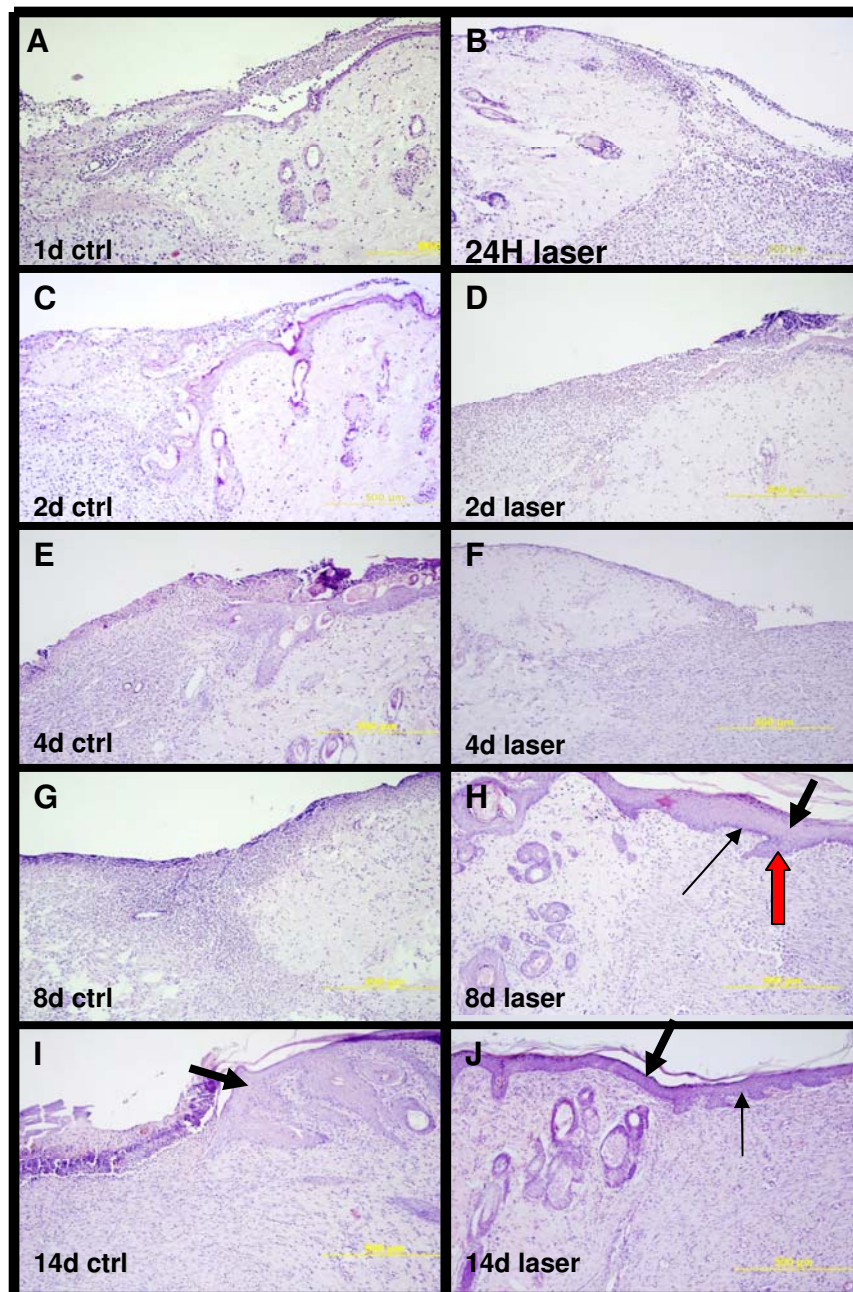
Nas imagens da Figura 7 com aumento de 100X, pode-se perceber com maiores detalhes as regiões de infiltrado inflamatório nos tempos um, dois, e quatro dias dos grupos controle e laser. Aos 8 dias, visualiza-se epitélio sobre o enxerto em G e H e sobre o tecido adjacente somente em H. Nota-se que em I, ainda não há epitélio sobre o tecido vizinho ao enxerto, enquanto que em J, há epitélio e papilas dérmicas.

Em ambos os aumentos, 40 e 100X, a partir de 8 dias, no grupo laser quase não se observa a área de transição entre o enxerto e o leito receptor; já no grupo controle essa condição só pode ser vista na imagem referente aos 14 dias.



**Figura 6.** Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por semeadura na coloração HE, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: círculo: infiltrado inflamatório; ex: enxerto; gr: tecido de granulação; seta: epitélio.





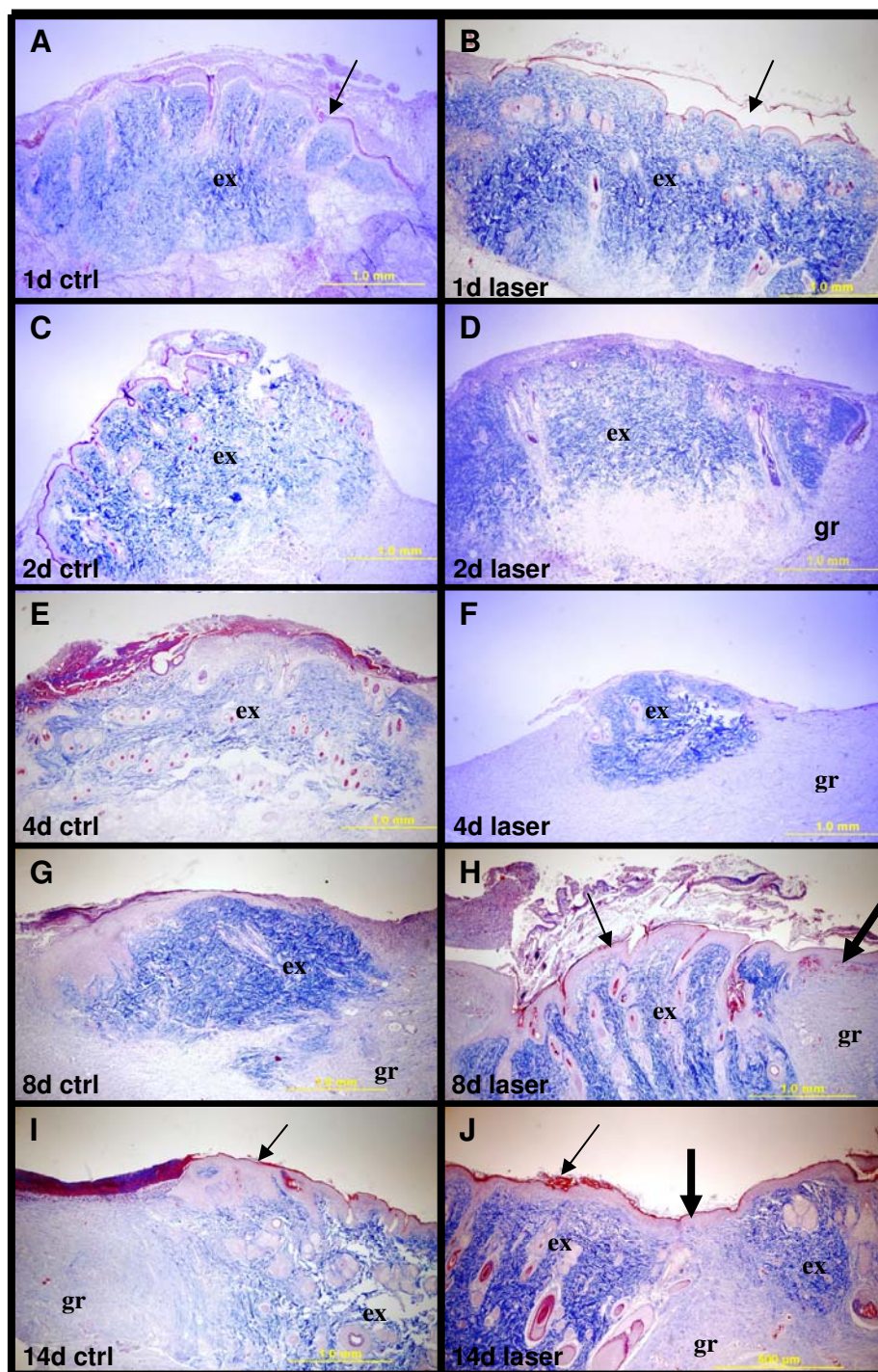
**Figura 7.** Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração HE, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; seta grossa, epitélio; e seta fina, papilas dérmicas; seta vermelha: crista epidérmica.

#### **4.2.2. Coloração Tricômio de Masson**

Essa coloração foi utilizada para destacar os vasos sanguíneos no tecido conjuntivo e também na superfície do enxerto a camada de epitélio e queratina. A Figura 8 contém cortes histológicos no aumento de 40X, nela pode-se visualizar aumento na proporção de colágeno em todos os períodos avaliados do GL em relação aos do GC. Nos dois grupos a queratina recobre a região do enxerto. A partir do oitavo dia ela aparece sobre o leito receptor de GL. No décimo quarto dia o GC só apresentava epitélio sobre o enxerto e no GL já se observavam papilas dérmicas.

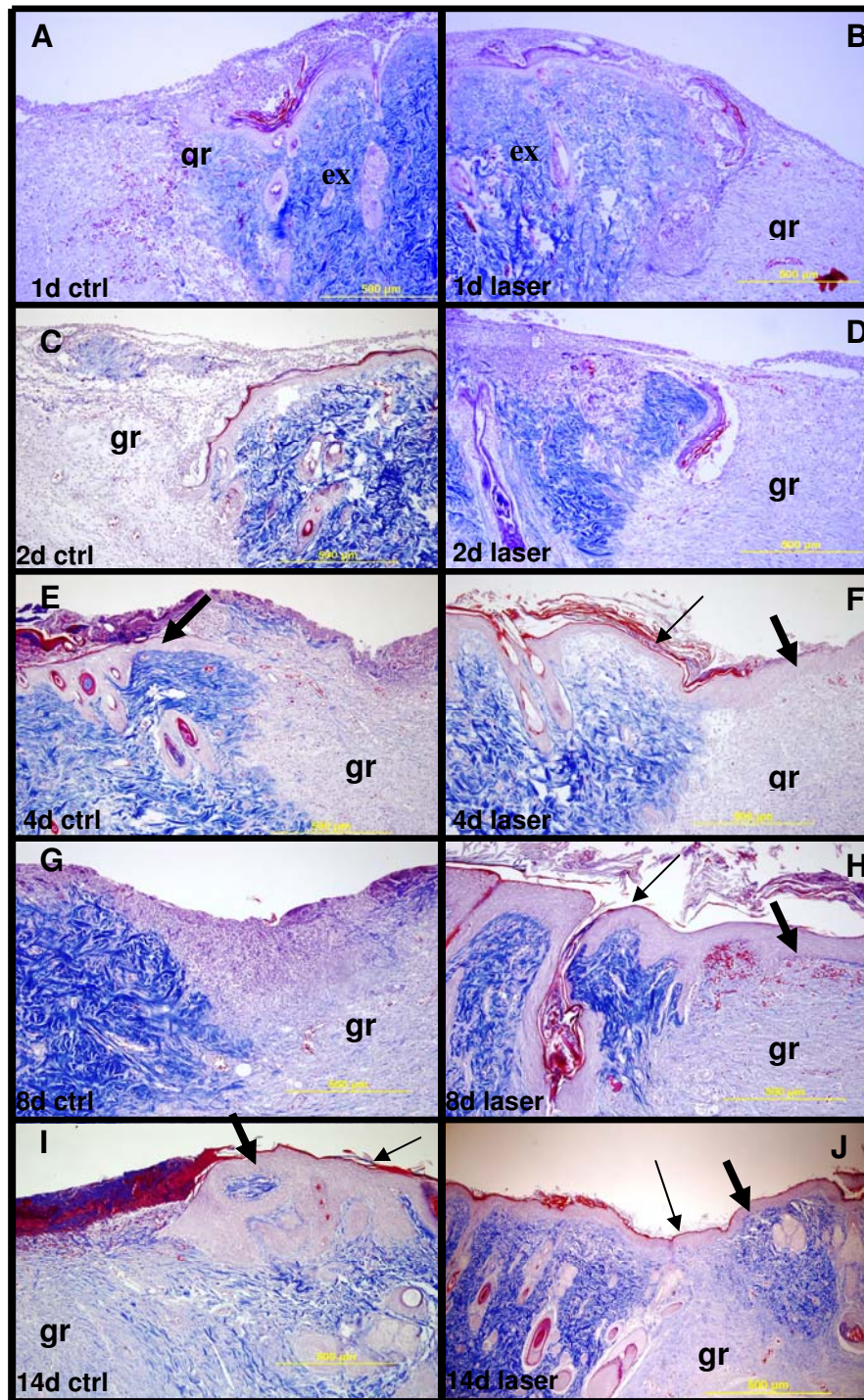
Na Figura 9, imagens com aumento de 100X, o GL a partir de quatro dias apresentava camada epidérmica sobre o tecido adjacente, e início da “propagação” da camada de queratina sobre o tecido de granulação. No GC a camada de queratina foi notada sobre o enxerto e tecido adjacente aos 14 dias e neste período o epitélio estava somente na região enxertada.

Imagens dos cortes histológicos corados com Tricômio de Masson (Figura 10), num aumento de 400X foram usadas para contagem dos vasos sanguíneos dos diferentes tempos e grupos.



**Figura 8.** Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração Tricômio de Masson, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; seta grossa: epitélio; e as setas finas apontam a camada de queratina.





**Figura 9.** Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por semeadura na coloração Tricômio de Masson, aumento de 100X, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: ex, enxerto; gr, tecido de granulação; seta grossa, epitélio; e as setas finas apontam a camada de queratina.

De acordo com as Figuras 6, 7, 8 e 9 (Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Masson), pode-se tabular os seguintes dados (Tabela 1):

**Tabela 1:** Análise qualitativa dos cortes histológicos em cada tempo, e tratamento, em relação a quantidade de infiltrado inflamatório, presença de epitélio e queratina. FCAV/UNESP/JABOTICABAL, 2009.

| <b>Aspecto<br/>Analisado</b>     |                | <b>Infiltrado<br/>Inflamatório</b> |              | <b>Presença de<br/>Epitélio</b> |              | <b>Presença de<br/>Queratina</b> |              |
|----------------------------------|----------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
| <b>Tratamento</b>                |                | <b>Ctrl</b>                        | <b>Laser</b> | <b>Ctrl</b>                     | <b>Laser</b> | <b>Ctrl</b>                      | <b>Laser</b> |
| <b>T<br/>e<br/>m<br/>p<br/>o</b> | <b>1 dia</b>   | +++                                | ++           | +                               | +            | +                                | +            |
|                                  | <b>2 dias</b>  | ++                                 | +            | +                               | +            | +                                | +            |
|                                  | <b>4 dias</b>  | ++                                 | +            | +                               | ++           | +                                | ++           |
|                                  | <b>8 dias</b>  | +                                  | -            | +                               | +++          | +                                | +++          |
|                                  | <b>14 dias</b> | -                                  | -            | +                               | +++          | ++                               | +++          |

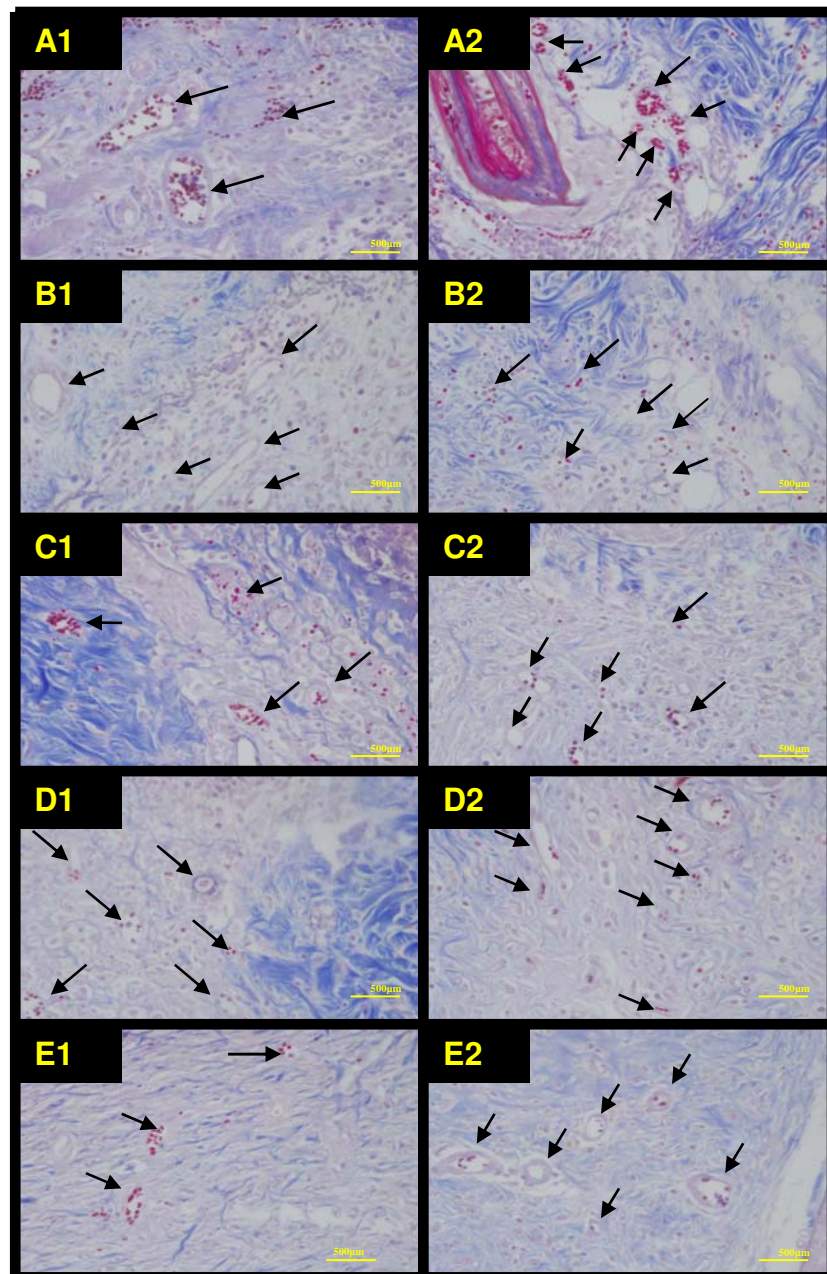
Ctrl – controle

Infiltrado inflamatório: - Não significativo  
+ infiltrado difuso  
++ infiltrado moderado  
+++ infiltrado intenso

Presença de epitélio: - sem epitélio  
+ com epitélio somente sobre o enxerto  
++ com epitélio desorganizado  
+++ com epitélio espesso e organizado

Presença de queratina: + presente somente sobre o enxerto  
++ presente sobre o enxerto e parte do tecido adjacente  
+++ presente sobre o enxerto e recobrindo todo o tecido adjacente





**Figura 10.** Imagens fotográficas dos cortes histológicos corados com Tricômio de Masson, evidenciando alguns vasos sanguíneos (setas) na região intermediária entre o enxerto e o leito receptor. Nas imagens, as letras referem-se aos tempos: 1dia após a realização do enxerto; B: 2 dias; C: 4 dias; D: 8 dias; E: 14 dias. Os números indicam os grupos: 1 ctrl; 2 laser.

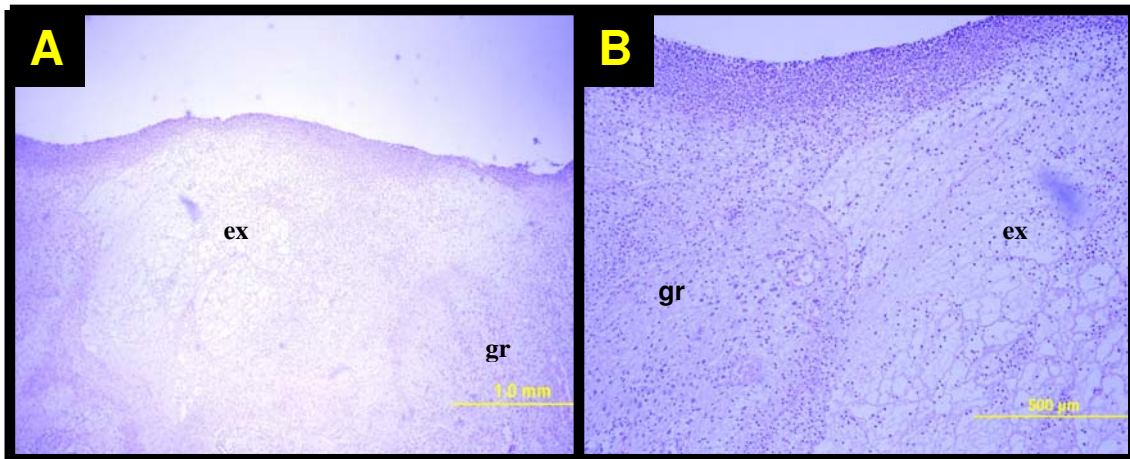
Os dados referentes à contagem dos vasos sanguíneos foram tabulados (Tabela 2) e submetidos à seguinte análise estatística pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05.

**Tabela 2:** Valores das médias da contagem do número de vasos em cada tempo e tratamento FCAV/UNESP/JABOTICABAL, 2009.

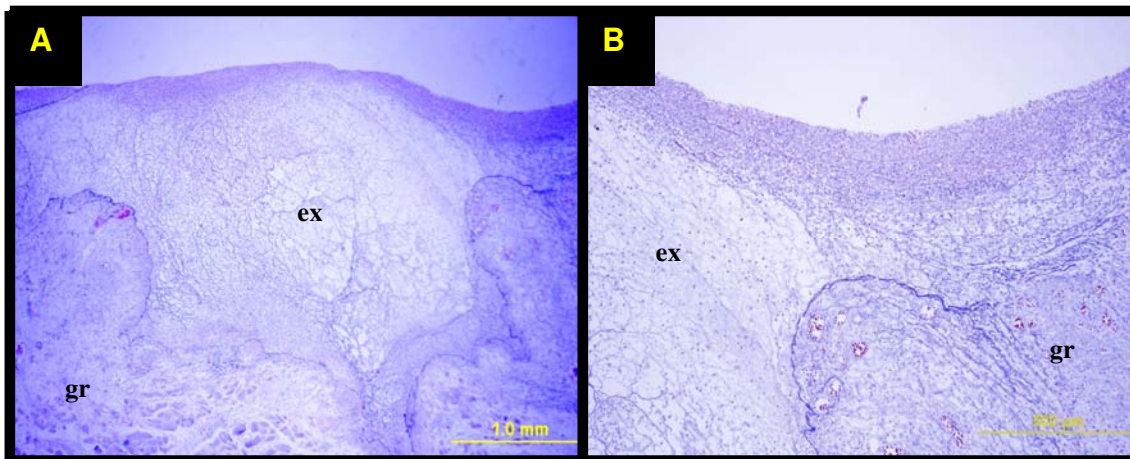
| <i><b>Tempos</b></i> | <i><b>Médias do número de vasos</b></i> |   |              |   |
|----------------------|-----------------------------------------|---|--------------|---|
|                      | <b>Controle</b>                         |   | <b>Laser</b> |   |
| 1 dia                | 25,75                                   | A | 32,50        | A |
| 2 dias               | 14,00                                   | B | 25,25        | B |
| 4 dias               | 21,50                                   | B | 12,50        | B |
| 8 dias               | 15,25                                   | B | 20,75        | B |
| 14 dias              | 11,25                                   | B | 14,00        | B |
| <b>Média Final</b>   | 17,55                                   | a | 21,00        | b |

Médias dentro de um mesmo tratamento com letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%. Já as médias entre os tratamentos com letras minúsculas, diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

Em um dos animais do grupo controle eutanasiado no segundo dia, verificou-se a necrose do enxerto somente à microscopia. As Figuras 11 e 12 mostram as fotomicrografias das lâminas com o enxerto necrosado num aumento de 40 e 100X, nas colorações Hematoxilina – Eosina e Tricômio de Masson, respectivamente.



**Figura 11.** Fotomicrografia do corte histológico da região de enxerto por semeadura de um animal do grupo controle sacrificado com 2 dias corado com hematoxilina e eosina. A: aumento de 40X, B: aumento de 100X. As letras inseridas na imagem significam: ex: o enxerto necrosado, gr: o tecido de granulação do leito receptor.



**Figura 12.** Fotomicrografia do corte histológico do enxerto por semeadura necrosado de um animal do grupo controle com 2 dias corado com Tricômio de Masson. A: aumento de 40X, a B de 100X. As letras inseridas na imagem significam: ex: a região do enxerto necrosado, gr: tecido de granulação.

## 5. DISCUSSÃO

Para delinear nosso estudo, a princípio pensou-se em utilizar os flancos de um mesmo animal, um deles serviria como controle e outro como grupo experimental, mas como os trabalhos de Lucas et al. (2002), Damante et al. (2004) sugeriram ação sistêmica do laser, optou-se pelo uso de dois grupos separados.

O leito receptor, criado na primeira fase do experimento, foi coberto com a biomembrana natural de látex para garantir uma granulação rápida e com tecido receptor de boa qualidade (PELE NOVA, 1999; ERENO, 2005; SILVA, 2006), resultado este, obtido com sucesso.

Na segunda fase do experimento – enxertia por sementeira, foi empregado um *punch* para a coleta dos auto-enxertos de espessura total e implante nos poços do leito receptor. (PAVLETIC et al., 1986; PAVLETIC, 1986, 1993 e 1998; POPE, 1988; SWAIN, 1990 e 1998).

O sucesso na enxertia por sementeira está relacionado a cuidados com a técnica empregada. Para tanto seguiu-se as indicações de Pope (1988) e Swain (1998) realizando cuidadosa hemostasia após a criação dos poços para evitar hematomas e seromas, além de utilizar bandagem sobre a ferida no pós-operatório com o intuito de promover imobilização e contato adequado entre o enxerto e o leito receptor. Além disso, no pré-operatório a assepsia preconizada por Pavletic (1993) foi feita de forma rigorosa em todos os procedimentos. Apesar de todos esses cuidados, um dos animais operados apresentou necrose do enxerto, talvez por movimentação entre este e o leito receptor o que impediu a conexão entre os vasos sanguíneos (PAVLETIC, 1993).

A ausência de secreção sobre as feridas do GL pode ser atribuída a ação anti-infecciosa do laser (KARU, 2004 e WALKER, 2000 citados por NASCIMENTO et al., 2004) já que os dois grupos receberam uma única dose de antibiótico e no GC ela esteve presente.

Os animais do GL não mostraram alteração comportamental, nem de ingestão de água e ração após os procedimentos cirúrgicos, sugerindo a ação analgésica do laser (MAIER et al., 1993 e LOW & REED, 2001; ENWEMWKA et al., 2004; RE & VITERBO citados por MAZZANTI et al., 2004; FERREIRA et

al., 2009). Os animais do GC também não apresentaram tais alterações, sendo assim este parâmetro deve ser investigado de uma maneira mais específica como a dosagem de substâncias endógenas, por exemplo o cortisol, que fornece valores mais específicos para isso.

O fato da ferida do GL estar com aspecto mais hemorrágico do que a do GC no segundo dia se deve a ação do laser em tornar a reação inflamatória mais aguda e de mais rápida resolução (Viegas et al., 2007). A ferida do GC adquiriu esta característica no terceiro dia.

O grupo controle com 4 dias, ao contrário do grupo laser, apresentava uma ferida mais avermelhada sugerindo a presença de inflamação, este resultado foi também percebido nos cortes histológicos com coloração de hematoxilina e eosina, onde o infiltrado inflamatório pode ser visualizado. Este tipo de resposta foi relatado por Viegas et al. (2007), que caracteriza a ação do laser como aceleradora do processo inflamatório e não como anti-inflamatória como afirmam Maier et al. (1993) e Rocha Júnior et al.(2006), Araújo et al. (2007).

Visto que a cicatrização é um processo complexo que se inicia com a reação inflamatória, a afirmação de Viegas et al. (2007), explica melhor a ação do laser em relação à diminuição do tempo de cicatrização: quanto mais rápido cessar a fase inflamatória, mais rapidamente se inicia a fase reparadora e mais cedo a cicatrização acontece por completo, como ocorreu neste estudo, onde o grupo laser aos 14 dias estava com a ferida cicatrizada enquanto o controle ainda se encontrava no início da epitelização. Oliveira et al. (2008) corroboram esta informação quando relatam que o laser acelera a primeira e a segunda fase do processo cicatricial.

Essa epitelização mais precoce nos animais que receberam o tratamento com laser pode ser visualizada macroscopicamente e também nos cortes histológicos, isso se deve ao aumento da proliferação celular (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2006; ARUN MAIYA et al., 2005), a mitose de células epiteliais (PESSOA et al., 2004) e na produção de fatores de crescimento celular (CHEN et al., 2008).

A presença de papilas dérmicas e cristas epidérmicas aos 14 dias no grupo laser, mostra o grau de organização tecidual e também a qualidade do reparo, pois estas tem função de fixação do epitélio ao tecido de granulação. A

literatura consultada não relata em seus resultados a presença deste tipo de formação, somente que a qualidade do tecido cicatricial é melhor quando este tipo de tratamento é empregado em feridas cutâneas (PUGLIESE et al., 2003; VIEGAS et al., 2007) e em tendões (ARRUDA et al., 2007; ELWAKIL, 2007).

A queratinização foi observada nos cortes histológicos, corados com Tricômio de Masson, no GL a partir de 4 dias e no controle a partir dos 14, isto devido provavelmente ativação do queratinócitos (POSTEN et al., 2005).

A vascularização é um fator crucial na incorporação do enxerto ao leito receptor. A ação angiogênica do laser (MAIER et al., 1993, NÚÑES et al., 2004, POSTEN et al. 2005, ROCHA JUNIOR et al., 2006) foi confirmada no presente trabalho, que revelou pela contagem, maior número de vasos sanguíneos no GL, resultado considerado estatisticamente significativo em relação à do GC.

Os efeitos benéficos da laserterapia neste trabalho podem estar relacionados com o comprimento de onda alto (904nm), e a baixa potência, (0,02W) pois Nascimento et al. (2004) afirmam que para um melhor efeito essas grandezas devem ter valores inversamente proporcionais.

## **6. CONCLUSÃO**

Por meio deste estudo foi possível concluir que o laser de baixa intensidade:

- a. acelerou o processo cicatricial das feridas enxertadas
- b. estimulou angiogênese na interface enxerto-leito receptor
- c. promoveu epitelização e queratinização mais precocemente no GL em comparação com o GC.

## 7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. E. N.; RIBEIRO, M. S.; FAVARO, R.; ZECELL, D. M.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in HeNe laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biology**, Lausanne, v.86, p.87-96, 2007.

ARRUDA, E. R. B.; RODRIGUES, N. C.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v.11, n.4, p. 283-88, 2007.

ARUN MAIYA,G.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of low intensity Helium-Neon (HeNe) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v.23, n. 2, p. 187-190, 2005.

CARVALHO,P.T.C.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H. Morphometric analysis of the percentage of collagen and number of macrophages highlighted by immunohistochemistry in cutaneous wounds in diabetic and non diabetic rats treated through HeNe laser. **Lasers in Medical Science**, London, v.18, n.6, suppl 2, p.2003.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N. ; REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low Power He NE laser on the healing of skin wounds in diabetic and non diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.3, p.177-183, 2006.

CHEN, C. H.; TSAI, J. L.; WANG, Y. H.; LEE, C. L.; CHEN, J. K.; HUANG, M. H.. Low-level irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine achilles tendon fibroblast *in vitro*. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, p.1-5, 2008.

DAMANTE, C. A.; GREGHI, S. L. A.; SANTA'NA, A. C.; PASSANEZI, E. Clínica; evaluation of the effects of low-intensity laser (GAALAS) on wound



healing after gingivoplasty in humans. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 2, p. 133-6, 2004.

ELWAKIL, T. F. An in-vivo experimental evaluation of HeNe laser photostimulation in healing Achilles tendons. **Lasers in Medical Science**, London, v.22, p.53-9, 2007.

ENWEMEKA, C. S.; PARKER, J. C.; DOWDY, D. S.; HARKNESS, E. E.; SANFORD, L. E.; WOODRUFF, L. D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v.22, vol. 22, n. 4, p. 323-329, 2004.

ERENO, D. Curativo de Borracha. **Revista Pesquisa Fapesp**. São Paulo, v. 6, n. 88, 2003. Disponível em: <  
<http://www.fapesp.org.br/revistapesquisa.fapesp.br>>. Acesso em: 15 dez. 2005.

FERREIRA, M. C.; GAMEIRO, J.; NAGIB, P. R. A.; BRITO, V. N.; VASCONCELLOS, E. C. C.; VERINAUD, L. Effect of low-level Helium-Neon (HeNe) laser irradiation on experimental paracoccidioidomycotic wound healing dynamics. **Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 85, p. 227 – 233, 2009.

FRADE, M. A. C.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N.; CURSI, I. Natural latex biomembrane in diabetic patient. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY, 61., 2003; San Francisco. p. 21-26, 2003

FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. Stimulation of diabetic wound healing by natural latex biomembrane dressing. In: WORLD CONGRESS OF DERMATOLOGY, 20., 2002, Paris. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**. Paris: Masson Editeur, 2002, p. 2317.

FRADE, M. A. C.; VALVERDE, R. V.; ASSIS, R. V. C.;COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. Chronic flebophatic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, Hagerstown, v. 40, p. 237-240, 2001.

FREITAS, M. A. S. **Uso de próteses do composto de látex natural em arterioplastias femorais. estudo experimental em cães.** Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v.24, n. 6, p.705-714, 2006.

KHADRA, M.; RONONOLD, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAANES, H. R. Low-level laser therapy stimulates bone implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, Brussels, 15, 325-332, 2004.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada. Princípios e Prática.** 3.ed. Barueri:Editora Manole, 2001, p. 389- 409.

LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.;MARQUES,T.;SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES,S.P. **Manual para técnicos em bioterismo.** 2.ed. São Paulo: Winner Graph , p. 161 1996

LUCAS, C.; CRIENS-POUBLON, COCKRELL, C. T.; HAAN, R. J. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low-level laser therapy; were clinica studies justified? A systematic review. **Lasers in Medical Science**, London, v.17, p.110-134, 2002.

MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M.; Effect of low laser energy laser on the growth and regeneration of capillaries. **Laser Therapy**, Basel,v.5, n. 2, p. 79-87, 1993.

MATERA,J.; TATARUNAS, A. C.; OLIVEIRA, S. M. Uso do laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplástica do fêmur em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo 2003. v.18, n.2, p.102-106, 2003.

MAZZANTI, A.; RAISER, A.G.; PIPPI, N. L.; BARROS, C. S. L.; BRONDANI, J. T.; MARIN, A.; SILVA, T. R.; HILLE, R.; SALBEGO, F. Z.; STIEVEN, D.; ROHDE, R.; DALMOLIN, F. Homoimplante ortotópico conservado, associado à terapia “soft-laser” na reparação tenopatelar em cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 429-437, 2004.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por Biomembrana® de látex natural com polilisina – aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal – Estudo experimental em cães**. 110 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. **Substituição de esôfago cervical por prótese biossintética de látex: estudo experimental em cães**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.;THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new membrane. **Materials Research**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 277 – 283, 2001.

NASCIMENTO, P. M.; PINHEIRO,A. L. B.; SALGADO, M. A. C.; RAMALHO, L. M. P. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 22, n. 6, p. 513-518, 2004.

NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M. D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v.33, p. 619-624, 2006.

NÚÑES, S. C.; NOGUEIRA, G. E. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S.; LAGE-MARQUES, J. L. HeNe laser effects on blood microcirculation during wound healing: a method on in vivo study through laser doppler flowmetry. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v 35, p. 363-368, 2004.

OLIVEIRA, R. F.; PIRES OLIVEIRA, D. A. A.; MONTEIRO, W.; ZANGARO, R. A.; MAGINI, M.; SOARES, C. P. Comparasion between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation *in vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, vol. 26, n. 1, 2008.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal reconstriuctive surgery**. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1993 p. 242 – 245.

PAVLETIC, M.M. Skin Grafting and graft survival on the secondary contraction of full-thickness skin grafts techniques. In BOJRAB, M. J.; ELLISON, G. W.; SLOCUM, B. **Current techniques in small animal surgery**. 4th. ed Baltimore: M. D. Willians & Wikins, 1998. p. 585-603.

PAVLETIC, M.M.; PEYTON, L.C. Cirurgias plástica e reconstrutiva nos cães e gatos. In: BOJRAB, M. J. **Cirurgia dos pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. p. 461-477.

PELE NOVA BIOTECNOLOGIA **Biocure**: membrana natural para cicatrização. São Paulo, 26 páginas. (Monografia do Produto), 1999.

PESSOA, E. S.; MELHADO, R. M.; THEODORO, L. H.; GARCIA, V. G. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treatd animals. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 22, n.3, p. 199-204, 2004.

PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, S. J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, p. 27 – 32, 2004.

POPE, E. R. Skin grafting in small animal surgery. Part I The normal healing process. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.10, n.8, p. 915-923, 1988a.

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

POTÉRIO-FILHO, J.; SILVEIRA, S. A. F.; POTÉRIO, G. M. B.; MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J. O uso do látex natural com polilisina 0,1% na cicatrização de úlceras isquêmicas. **Revista Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular**, Belo Horizonte, p.156, 1999.

PUGLIESE, L. S.; MEDRATO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 307-313, 2003.

REEDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing in rabbit Achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 22, p. 281-287, 1998.

ROCHA JUNIOR, A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; AARESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 2006; v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE, D. L. Skin grafts In: McCARTHY, J.G.; MAY, J.W.; LITTLER, J.W. **Plastic surgery**. Saunders: Philadelphia, 1990. p. 221-274.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETO, J.; MAZZETO, S. A.; ALVES-JR, P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 15, n.4, p. 338-344, 2000.

SILVA, E. B., **Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com fenda palatina experimentalmente induzida**. 36 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

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

SWAIN, S. F. Enxertos Cutâneos. In Swain, S. F. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed., São Paulo: Manole, v. 1, 1998, p. 402-419.

TALIERI, I. C. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina, utilizada como enxerto em esclerectomias lamelar e penetrante em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, LINNAEUS, 1758)**. 91 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

THOMAZINI, J. A.; MRUÉ, F.; LACHAT, J. J.; ZBOROWSKI, A. C.; DURAN, J. R. H.; CENEVIVA, R.; COUTINHO-NETTO, J. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. **Acta Microscopica**, Caxambu, v. 6, suppl. B, p. 798-799, 1997.

VIEGAS, V. N.; ABREU, M. E. R.; VIEZZER, C.; MACHADO, D. C.; SANTA'NA FILHO, M.; SILVA, D. N.; PAGNONCELLI, R. M. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparasion with meloxicam. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 25, n. 6, p. 467-473, 2007.