

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

[*Skin graft epithelialization in rabbit fresh wounds treated with amniotic membrane and/or laser therapy*]

N. Reis Filho, M. Ferreira, A. Pascoli, R. Viéra, J. Pazzini, R. Oliveira, I. Salardani, P. Silva, L. Rosseto, S. Albernaz, R.O. Vasconcelos, A. Ferraudo, P.C. Moraes, A. Nardi

Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, SP

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: amniotic membrane, epithelialization, laser therapy, skin grafts

Recebido em 2 de novembro de 2016

Aceito em 23 de novembro de 2016

E-mail: nazilton@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A técnica de enxertia cutânea é uma das maneiras mais simples de cobrir um defeito superficial de pele. O intuito da aplicação do enxerto de pele é restabelecer a barreira cutânea, sobretudo em defeitos que não podem ser reconstituídos por justaposição direta ou por retalho de pele (Andreassi *et al.*, 2005; Fowler, 2006). Embora amplamente utilizada em medicina, a enxertia cutânea tem seu uso limitado em animais domésticos, pois é necessário que a ferida apresente leito com tecido de granulação saudável, ausência de tecido necrótico, de infecção e de corpos estranhos, para que o enxerto cicatrize de forma adequada (Fowler, 2006). Em muitos casos, até que se obtenha esse ambiente desejável para a aplicação do enxerto, é necessário o tratamento da ferida por segunda intenção, o que requer grande disponibilidade e cuidado por parte do proprietário, além de onerar o tratamento. Portanto, esses fatores podem contribuir para a diminuição da indicação da técnica (Miraliakbari e Mackay, 2006; Tong e Simpson, 2012).

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

Diante da problemática exposta, este trabalho teve por objetivo comparar o emprego da membrana amniótica canina e da LBI, como potenciais estimulantes da cicatrização em

enxertos cutâneos aplicados em feridas recém-criadas em coelhos, com o intuito de proporcionar um processo cicatricial mais eficiente e ampliar a aplicabilidade da enxertia cutânea em casos em que o leito da ferida é pobre em fornecer boa nutrição ao enxerto.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, estado de São Paulo, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua/FCAV) sob o protocolo número 018677/14.

O procedimento cirúrgico foi realizado em 42 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos da raça Nova Zelândia Branco, distribuídos em quatro grupos: 10 coelhos do grupo controle (GC), 12 do grupo membrana (GM), 10 do grupo laser (GL) e 10 do grupo membrana e laser (GML).

Após a aplicação do protocolo anestésico, o enxerto foi extraído da região doadora (RD), localizada na parede lateral do tórax direito, e posicionado na região receptora (RR), porção cutânea da região crânio-lateral do terço médio de rádio e ulna do membro torácico direito. Na RR foi realizada uma incisão quadrada de pele e no subcutâneo, que media 2 x 2cm, utilizando-se lâmina de bisturi número 15. O fragmento foi inteiramente removido e, posteriormente, descartado. O mesmo procedimento foi repetido na RD, entretanto o fragmento foi usado como enxerto. Toda a porção subcutânea do enxerto foi removida cuidadosamente com tesoura, até que permanecesse somente a derme e a epiderme. Em seguida, foram realizadas pequenas fenestras no sentido crescimento do pelo do enxerto, com auxílio de lâmina de bisturi número 11. O enxerto foi posicionado na ferida da RR e suturado junto às bordas, utilizando-se pontos simples separados com fio de sutura náilon 3-0. A RD foi suturada com pontos em padrão simples contínuo, empregando-se náilon 3-0. Tanto na ferida da RR como da RD foram realizadas bandagens não aderentes, compostas por gaze estéril umedecida com solução fisiológica e atadura, fixadas com esparadrapo.

Epitelização de enxertos...

Os pacientes do GC foram submetidos ao procedimento cirúrgico exatamente como descrito acima. Já nos pacientes do GM, a membrana amniótica foi colocada entre o enxerto e a ferida. As membranas amnióticas utilizadas foram provenientes de cesariana de um único cão, fêmea, saudável, múltipara, com gestação de aproximadamente 60 dias e sem sinais de distocia materna. A placenta foi obtida de forma estéril durante o procedimento cirúrgico, processada segundo Mohammadi *et al.* (2013) e armazenada seguindo a metodologia de Barbosa *et al.* (2013). Anteriormente à sua aplicação, a membrana amniótica foi submetida ao processo de hidratação como descrito por Barbosa *et al.* (2013). Uma pequena amostra do meio de conservação foi enviada para cultura bacteriana e fúngica, para certificar-se de que não havia contaminação. Em seguida, a membrana foi recortada do mesmo tamanho da ferida, e foram realizadas pequenas perfurações de forma aleatória, com auxílio de uma agulha tamanho 40x16, para permitir a aderência e embebição plasmática do enxerto. A membrana foi posicionada com a face mesenquimal voltada para o leito da ferida. Sua fixação foi realizada com pontos simples separados nas quatro extremidades, utilizando-se fio poliglecaprona 25 4-0. O enxerto foi posicionado acima da membrana e fixado como descrito anteriormente no GC.

Os pacientes do GL foram submetidos à laserterapia imediatamente após o procedimento cirúrgico, como descrito para o GC. Foram escolhidos 12 pontos predeterminados para a aplicação do laser, utilizando-se o aparelho Laserpulse Ibramed® modelo L42, com caneta de comprimento de onda 660 nanômetros (nm) e 30 mW (*megawatt*) de potência. A dose utilizada foi de 4 J/cm² em frequência contínua, durante oito segundos, em cada ponto. O protocolo de laserterapia foi novamente aplicado nos pacientes no terceiro e sétimo dias de pós-operatório, no momento da troca do curativo, após a limpeza da ferida. Por fim, os pacientes participantes do GML receberam a membrana amniótica com o laser, dessa forma foram submetidos ao procedimento cirúrgico com a mesma técnica do GM, seguido da aplicação do laser assim como descrito no GL. No pós-operatório, os pacientes de todos os grupos receberam antibióticos, anti-inflamatórios e analgésicos. Os curativos foram trocados no terceiro e sétimo dias da cirurgia em todos os grupos de tratamento.

A avaliação física dos enxertos foi realizada por um avaliador único, às cegas, no terceiro, sétimo e 15º dias do pós-operatório. Os parâmetros estão descritos na Tab. 1.

Tabela 1. Parâmetros macroscópicos adotados para a avaliação da evolução das feridas cirúrgicas nos dias três, sete e 15 do pós-operatório de enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) em todos os grupos experimentais

Parâmetro avaliado	Descrição
Edema do enxerto ausente (EAUS)	Nenhuma tumefação do tecido adjacente à área do enxerto
Edema do enxerto moderado (EMOD)	Tumefação devido ao acúmulo de líquido intersticial em alguma porção da área do enxerto
Edema do enxerto intenso (EINT)	Toda a área do enxerto apresentava tumefação
Coloração do enxerto rósea (CEROS)	Área do enxerto predominantemente de coloração semelhante ao tecido normal
Coloração do enxerto pálida (CEPAL)	Área do enxerto predominantemente esbranquiçada
Coloração do enxerto escura (CEESC)	Área do enxerto predominantemente enegrecida
Quantidade de secreção no enxerto ausente (QSAUS)	Nenhuma secreção notada
Quantidade de secreção no enxerto moderada (QSMOD)	Alguma porção do enxerto com presença de secreção
Quantidade de secreção no enxerto intensa (QSINT)	Toda a área do enxerto apresentava algum tipo de secreção

No 15º dia de pós-operatório, os pacientes foram submetidos à eutanásia com propofol (dose-resposta) e aplicação de 20mL de cloreto de potássio, ambos por via endovenosa. Os fragmentos de pele enxertada foram totalmente removidos, abrangendo uma pequena porção de pele não enxertada, e armazenados em formol 10%, na proporção 1:9, por 48 horas, sendo, em seguida, transferidos para solução de álcool 70% até o momento do processamento. As amostras foram incluídas em parafina e submetidas a cortes transversais de 4µ (micrômetros) em micrótomo e, então, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e tricômico de Masson (TM).

As lâminas coradas com HE foram analisadas por avaliador único, às cegas, em microscópio Nikon® E200 utilizando objetivas de 4x, 20x e 40x, sequencialmente, seguindo os parâmetros descritos na Tab. 2. As lâminas coradas com TM foram fotografadas em toda a extensão do enxerto por meio do uso do *software* Motic Image-Pro Plus 2.0 ML, na objetiva de 4x. De forma aleatória, eram escolhidos três campos fotografados para a quantificação da área de formação do colágeno e do tecido de granulação, utilizando-se o *software* analisador de imagens Image-Pro Plus 4.0®. A área era dada em porcentagem pelo *software* e, então, dividida em três categorias, como descrito na Tab. 2.

Tabela 2. Parâmetros microscópicos adotados para avaliação da epitelização de enxertos cutâneos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), nas colorações de hematoxilina e eosina e tricômico de Masson, utilizados em todos os grupos experimentais.

Parâmetro avaliado	Descrição
Presença de inflamação ausente (IA)	Células inflamatórias, como heterófilos e linfócitos, não eram visualizadas no campo óptico
Presença de inflamação discreta (ID)	Células inflamatórias evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado inflamatório
Presença de inflamação moderada (IM)	Células inflamatórias em maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado
Presença de inflamação acentuada (IAC)	Células evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados
Relação enxerto x pele íntegra (RELI)	O enxerto encontrava-se totalmente integrado e conectado à ferida
Relação enxerto x pele degenerada (RELD)	A maior parte do enxerto estava desinserido de derme superficial
Reepitelização do enxerto ausente (REEA)	Ausência de epitélio no campo óptico
Reepitelização do enxerto discreta (REED)	Epitelização incompleta, com predomínio da área não reepitelizada
Reepitelização do enxerto moderada (REEM)	Epitelização incompleta, com predomínio da área reepitelizada
Reepitelização do enxerto acentuada (REEAC)	Reepitelização completa sobre o tecido conjuntivo
Presença de necrose no enxerto ausente (NA)	Células do enxerto, em sua totalidade, não apresentavam sinais como picnose nuclear, cariólise e eosinofilia do citoplasma
Presença de necrose no enxerto discreta (ND)	Sinais de necrose celular isolados
Presença de necrose no enxerto moderada (NM)	Sinais de necrose celular multifocal
Presença de necrose no enxerto acentuada (NAC)	Sinais de necrose celular em toda a extensão do enxerto
Colágeno discreto (CD)	0 a 33% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação
Colágeno moderado (CM)	34 a 66% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação
Colágeno acentuado (CAC)	67 a 100% de área de formação do colágeno e do tecido de granulação

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análises dos dados obtidos por meio da avaliação macroscópica dos enxertos cutâneos,

foi possível observar que, de modo geral, os pacientes dos grupos em que a membrana amniótica foi utilizada (GM e GML) apresentaram evidências de reação inflamatória acentuada, falha de integração do enxerto e coloração escura dele (Fig. 1). Nos pacientes do GC, o enxerto não integrou ao leito receptor na maioria dos casos (Fig. 1). Os pacientes do GL apresentaram o melhor aspecto do enxerto no último dia de avaliação, além da ausência de sinais de inflamação (Fig. 1).

Por meio da análise de correspondência múltipla entre todos os grupos de tratamento, não foi

possível identificar a existência de um processo em que houvesse alguma associação entre si. Entretanto, após a aplicação da análise de correspondência simples, alguns processos foram identificados separadamente em cada grupo. Uma correspondência significativa ($P < 0,01$) entre CEPAL 7 e EMOD 15 e outra entre CEPAL 15 e EMOD 15 foram notadas no GC. Também foi observada no GC correspondência significativa ($P < 0,05$) entre CEPAL 7 e QSMOD 15 (Fig. 2). Conceitualmente, o enxerto não possui suprimento sanguíneo autônomo, fato este que torna a sua integração com a ferida dependente de fatores que contribuam para o processo cicatricial (Andreassi *et al.*, 2005; Miraliakbari e Mackay, 2006). Portanto, nos pacientes do grupo GC infere-se que o leito receptor, constituído, neste caso, de tendões e de tecido muscular sem granulação, não proporcionou suprimento sanguíneo adequado, pois foi observada coloração pálida do enxerto nos dias sete e 15 do pós-operatório. O enxerto possui inicialmente coloração pálida e branca, entretanto, quando ocorre completa vascularização entre o quinto e sétimo dias, há uma modificação para cor rósea, que confirma a integração do enxerto (Andreassi *et al.*, 2005).

Tong e Simpson (2012) relatam boa resposta clínica em enxertos aplicados em feridas imediatamente após a sua criação, assim como ocorreu no presente trabalho. Naquele estudo, os enxertos eram em porção distal de membro de cães submetido à excisão tumoral. Entretanto, trata-se de um estudo retrospectivo de apenas sete casos clínicos, em que diversos fatores podem ter interferido no processo de cicatrização, como *status* clínico dos pacientes, tipo da neoplasia e localização da lesão, ficando difícil uma correlação direta com um estudo controlado na presente pesquisa.

Os eventos CEPAL 7, QSMOD 15 e EMOD 15 estão associados, ou seja, a ocorrência de um fator é dependente de outro correspondente. Tal fato indica a presença de reação inflamatória no 15º dia do processo de cicatrização, podendo ser justificada tentativa de degradação do enxerto desvitalizado. Miraliakbari e Mackay (2006) apontam que a baixa capacidade do leito receptor

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

Já em relação à coloração do enxerto, houve grande predomínio de enxertos róseos do GL no 15º dia pós-operatório e de coloração escura para os grupos GM e GML no mesmo período. Ademais, observou-se que a maioria dos enxertos do GL permaneceu rósea desde a primeira avaliação. Este achado sugere que a laserterapia acelerou o processo de cicatrização do enxerto, corroborando diversos estudos (Andreassi *et al.*, 2005; Posten *et al.*, 2005; Corazza *et al.*, 2007), pois, na fase inicial, ainda se esperava que o enxerto estivesse pálido.

Por meio da análise microscópica das amostras, foi possível observar um processo cicatricial mais eficiente nos pacientes do GL quando comparado aos outros grupos de tratamento. Na maioria das amostras desse grupo, observou-se intensa integração do enxerto à derme, reepitelização acentuada e escassas células inflamatórias no local do enxerto (Fig. 3). O contrário foi observado nos pacientes dos grupos GM e GML, em que a presença da membrana amniótica parece ter induzido uma resposta inflamatória bastante consistente na região adjacente à membrana e ao enxerto. Já os enxertos do GC, embora não tenham apresentado reação inflamatória tão evidente, não tiveram boa integração do enxerto à derme superficial e apresentaram áreas de reepitelização parciais.

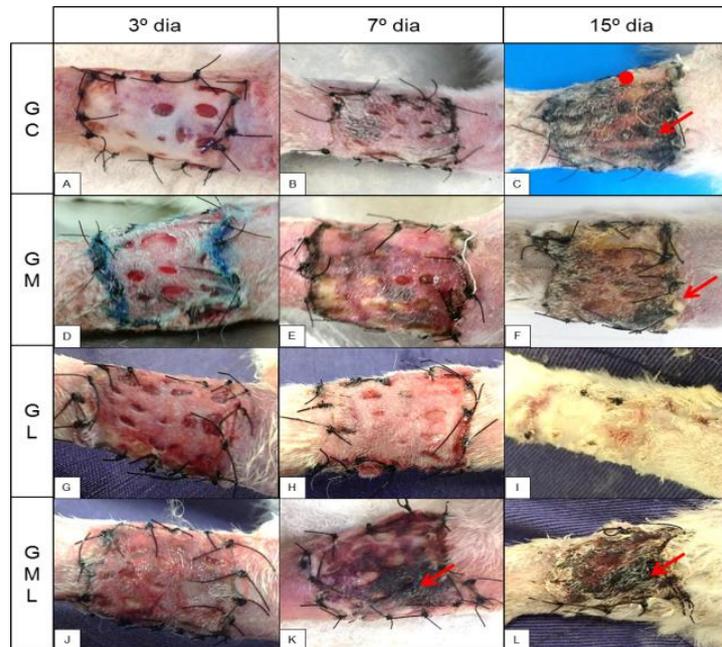


Figura 1. Fotografias ilustrativas da evolução clínica de enxertos cutâneos realizados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) em quatro grupos de grupos de tratamentos distintos e durante três momentos de avaliação macroscópica. A) Aparência macroscópica do enxerto no terceiro dia de pós-operatório (PO) de coelho do grupo controle (GC). B) Sétimo dia de PO do GC. C) 15º dia de PO do GC; observar área de necrose (seta) e integração parcial do enxerto (círculo). D) Terceiro dia de PO do grupo membrana (GM). E) Sétimo dia de PO do GM. F) 15º dia de PO do GM; observar secreção purulenta (seta). G) Terceiro dia de PO do grupo laser (GL). H) Sétimo dia de PO GL. I) 15º dia de PO do GL; notar integração total do enxerto. J) Terceiro dia de PO do grupo membrana e laser (GML). K) Sétimo dia de PO de coelho do GML; observar área de necrose (seta). L) 15º dia de PO do GML; observar área de necrose (seta). Jaboticabal, 2015.

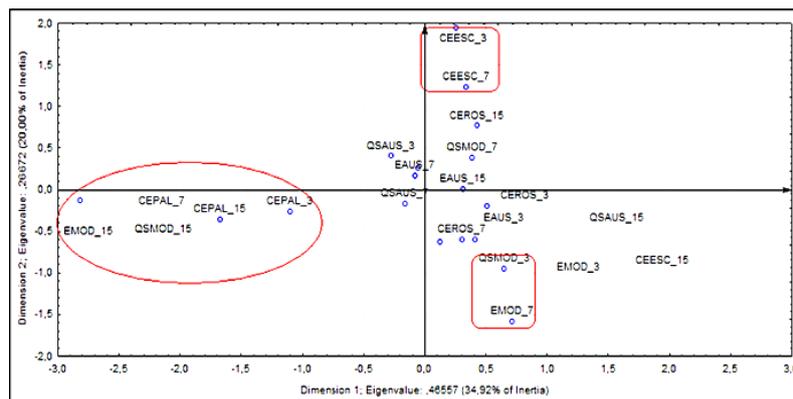


Figura 2. Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples da avaliação macroscópica da enxertia cutânea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) do grupo controle (GC). Os parâmetros presentes dentro do círculo apresentaram associação estatisticamente significativa, e os dentro dos retângulos, embora houvesse associação, não foram significativos.

Legenda: edema ausente (EAUS); moderado (EMOD); intenso (EINT); coloração do enxerto pálida (CEPAL); rósea (CEROS); escura (CEESC); quantidade de secreção ausente (QSAUS); moderada (QSMOD); intensa (QSINT). Os números 3, 7 e 15 correspondem aos dias das avaliações macroscópicas. Jaboticabal, 2015.

Epitelização de enxertos...

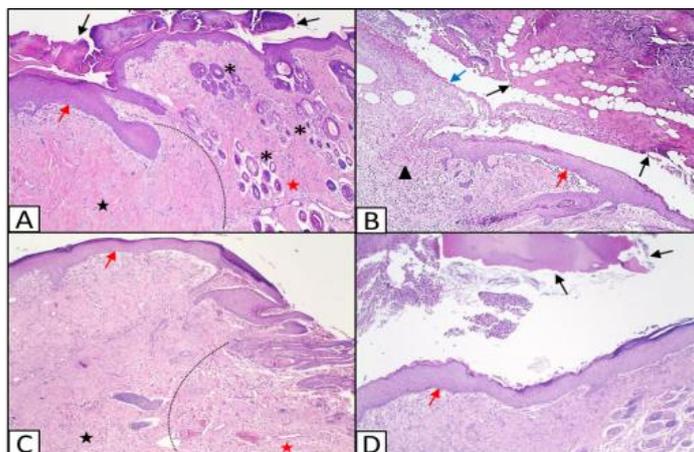


Figura 3. Fotomicrografia da pele de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à técnica de enxertia e divididos em quatro grupos distintos de tratamento. A) Área de transição (pontilhado) entre a epiderme original (estrela vermelha), com os anexos cutâneos (*), e o segmento reepitelização (seta vermelha), associada à proliferação de colágeno (estrela preta). Na superfície epidermal, verifica-se o enxerto desvitalizado e não integrado à região receptora (setas pretas/grupo controle). B) Derme superficial com acentuado infiltrado inflamatório (cabeça de seta), foco de reepitelização parcial (seta vermelha) e presença de enxerto degenerado (setas pretas) e não integrado à derme (seta azul/grupo membrana). C) Transição (pontilhado) entre a pele original (estrela vermelha) e a área de reepitelização (seta vermelha), com integração completa do enxerto (estrela preta/grupo laser). D) Reepitelização completa da pele (seta vermelha), sem integração do enxerto, que se encontra degenerado (setas pretas/grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2015.

Após a aplicação da análise de correspondência múltipla com os resultados de todos os tratamentos, foi possível a identificação de três grupos de categorias contendo correspondências específicas em cada um. O primeiro grupo diz respeito à presença de IAC, NAC, REED, REEA e RELD. Essa correspondência esteve presente nos grupos GM e GML e ausente no GL (Fig. 4), sendo estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Quadro 1). Tal fato demonstra de forma clara que a presença da membrana amniótica impediu a integração do enxerto ao leito receptor. Entre as principais propriedades da membrana amniótica estão a sua baixa imunogenicidade, a ação anti-inflamatória e a antibacteriana, além da promoção de estímulo à epitelização (Toda *et al.*, 2007; Niknejad *et al.*, 2013), o que não foi observado no presente estudo. A baixa imunogenicidade da membrana amniótica foi fator crucial para a escolha do modelo xenógeno neste estudo, já que essa característica é inerente ao seu papel de impedir que o feto seja rejeitado durante seu desenvolvimento (Kubo *et al.*, 2001). Diversos estudos demonstram sucesso na utilização do âmnion em modelo xenógeno, como o uso de membrana amniótica humana em

ratos e coelhos, a utilização da membrana amniótica equina em cães, entre outras combinações (Robson e Krizek, 1973; Barros *et al.*, 1998; Koizumi *et al.*, 2000; Kubo *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2003). Contudo, o modelo da aplicação da membrana amniótica canina em coelhos não tinha sido realizado anteriormente, criando a necessidade de investigações para elucidar se existe algum tipo de rejeição imunológica entre as espécies.

O segundo grupo de categorias identificou uma correspondência entre IA, NA, REEAC e RELI, específica do GL (Fig. 4). Essa associação é o oposto da primeira descrita e foi estatisticamente significativa entre IA e NA para $P < 0,10$, e para as demais associações para $P < 0,05$ (Quadro 1). O terceiro grupo de categorias envolveu uma correspondência entre ND, NM e REEM (Fig. 4), entretanto essa relação ocorre independentemente das duas primeiras e é estatisticamente significativa para $P < 0,10$ (Quadro 1).

Os efeitos clínicos da aplicação da LBI na modulação de processos cicatriciais são motivo

de numerosas discussões. Lucas *et al.* (2002) realizaram uma revisão sistemática de 36 estudos com resultados positivos e negativos do uso da LBI tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro*. Como conclusão, os autores não indicam o uso desse tipo de fototerapia como tratamento adjuvante no manejo de feridas, pois não há evidências suficientes para fundamentar a sua aplicação. Whinfield e Aitkenhead (2009), em estudo similar, ressaltam a escassez de

conhecimento dos mecanismos de ação e a falta de padronização para o uso terapêutico da técnica. Contudo, os achados do presente estudo mostram melhora evidente da epiteliação do enxerto quando a LBI foi utilizada de forma isolada (GL) e corrobora estudos que demonstraram a capacidade do laser na bioestimulação de feridas causadas experimentalmente em coelhos e ratos (Peplow *et al.*, 2010).

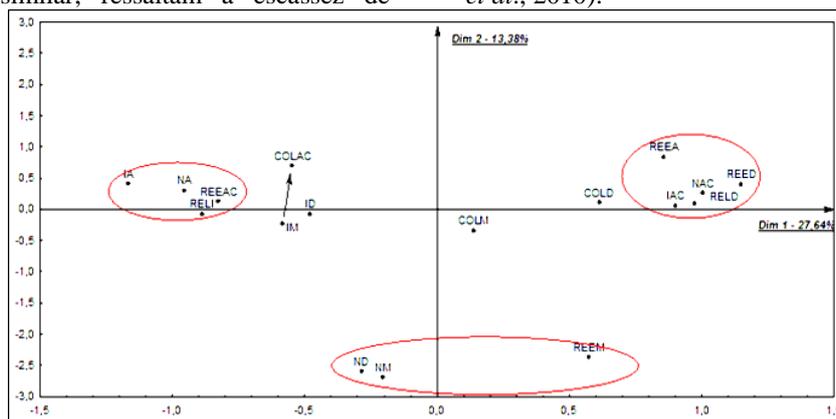


Figura 4. Mapa perceptual resultante da análise de correspondência múltipla dos achados microscópicos da enxertia cutânea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) entre todos os grupos de tratamento. Legenda: inflamação ausente (IA); discreta (ID); moderada (IM); acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); discreta (REED); moderada (REEM); acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); discreta (ND); moderada (NM); acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); moderada (COLM) e acentuada (COLAC). Jaboticabal, 2015.

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

Quadro 1. Matriz de correspondências entre as categorias analisadas dos achados microscópicos da enxertia cutânea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) entre todos os grupos de tratamento. Os valores em vermelho representam significância para P<0,05, e em azul para P< 0,10.

Legenda: inflamação ausente (IA); discreta (ID); moderada (IM); acentuada (IAC); relação enxerto x pele íntegra (RELI); degenerada (RELD); reepitelização ausente (REEA); discreta (REED); moderada (REEM); acentuada (REEAC); necrose ausente (NA); discreta (ND); moderada (NM); acentuada (NAC); formação de colágeno discreta (COLD); moderada (COLM); grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

Por meio da análise de fatores e da aplicação do teste de Fisher, foi possível observar que os tratamentos GM e GL diferem entre si ($P < 0,05$) (Tab. 3). Logo, é possível afirmar que quanto maior a quantidade de necrose, mais degenerado o enxerto estará, e também será maior a quantidade de inflamação presente. Esse fato ocorreu no GM, em que a maior parte da inflamação era constituída de heterófilos, na maioria das vezes próximo ao enxerto, e de linfócitos, localizados principalmente ao redor da membrana amniótica.

Tabela 3. Teste de comparações múltiplas de médias (LSD–Fisher) entre todos os tratamentos da enxertia cutânea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

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

Legenda: grupo controle (GC); grupo membrana (GM); grupo laser (GL); grupo membrana e laser (GML). Jaboticabal, 2015.

Vários dos resultados do presente estudo comprovam os efeitos de estimulação cicatricial causados pela LBI nos pacientes do GL e corroboram os estudos prévios (Araujo *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2007; Peplow *et al.*, 2010). Entretanto, nos pacientes do GML, a laserterapia não foi eficaz para promover os mesmos resultados, demonstrando, mais uma vez, a rejeição da membrana amniótica encontrada.

No presente estudo, a formação de colágeno e de tecido de granulação não dependeu dos outros fatores analisados e também não foi diferente em termos de quantidade entre os grupos de tratamento. Entretanto, foi observado que, no GL, o colágeno formado era predominantemente maduro e estruturado, enquanto este era mais jovem e desorganizado no GC (Fig. 5). Essa observação demonstra uma diferença de fases no processo de cicatrização entre os grupos, uma vez que a análise do colágeno e do tecido de granulação foi realizada no mesmo momento em todos os tratamentos.

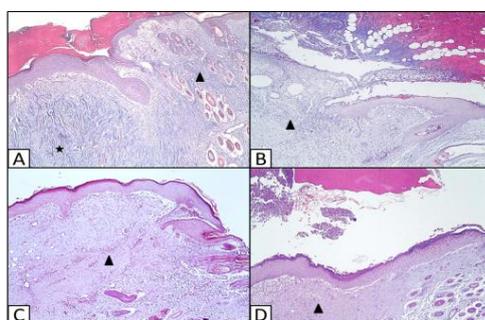


Figura 1. Fotomicrografia de pele de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à técnica de enxertia e divididos em quatro grupos distintos de tratamento. A) Área de intensa formação de colágeno jovem abaixo da área de reepitelização (estrela) em contraste com área do epitélio original, apresentando colágeno maduro (cabeça de seta/grupo controle). B) Área onde a formação de colágeno ocorreu pobremente devido à intensa inflamação local (cabeça de seta/grupo membrana). C) Presença de formação de colágeno maduro e estruturado com áreas de inflamação discreta (cabeça de seta/grupo laser). D) Área abaixo do epitélio reepitelizado, onde a formação de colágeno foi discreta (triângulo/grupo membrana e laser). Objetiva de 4x, coloração tricômico de Masson. Jaboticabal, 2015.

CONCLUSÃO

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

testadas, a laserterapia foi a única efetiva, contribuindo para o processo cicatricial e a integração do enxerto. Já a membrana amniótica canina não deve ser utilizada para esse fim em coelhos, pois provoca intensa reação inflamatória, além de impedir a nutrição do enxerto.

REFERÊNCIAS

- ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin. Dermatol.*, v.23, p.332-337, 2005.
- ARAUJO, C.E.; RIBEIRO, M.S.; FAVARO, R.; ZEZE, D.M. *et al.* Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.86, p.87-96, 2007.
- BARBOSA, A.; BARROS, P.S.D.M.; GUERRA, J.L.; OTSUKI, D.A. Ceratoplastia lamelar em cães usando membrana amniótica equina: estudo clínico e morfológico. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.50, p.211-219, 2013.
- BARROS, P.S.; GARCIA, J.A.; LAUS J.L.; FERREIRA A.L. *et al.* The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet. Ophthalmol.*, v.1, p.119-123, 1998.
- CORAZZA, A.V.; JORGE, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed. Laser Surg.*, v.25, p.102-106, 2007.
- FOWLER, D. Distal limb and paw injuries. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.36, p.819-845, 2006.
- GONÇALVES, W.L.S.; SOUZA, F.M.; CONTI, C.L.; CIRQUEIRA, J.P. *et al.* Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.40, p.877-884, 2007.
- KOIZUMI, N.; INATOMI, T.; QUANTOCK, A.J.; FULLWOOD, N.J. *et al.* Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*, v.19, p.65-71, 2000.
- KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.42, p.1539-1546, 2001.
- LOFÊGO FILHO, J.A.; DADALTI, P.; SOUZA, D.C.D.; SOUZA, P.R.C.D. *et al.* Skin grafts in cutaneous oncology. *An. Bras. Dermatol.*, v.81, p.465-472, 2006.
- LUCAS C.; CRIENS-POUBLON L.J.; COCKRELL C.T.; HAAN R.J. Wound healing in cell studies and animal model experiments by Low Level Laser Therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med. Sci.*, v.17, p.110-134, 2002.
- MELLER, D.; PIRES, R.T.; MACK, R.J.; FIGUEIREDO, F. *et al.* Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*, v.107, p.980-989, 2000.
- MIRALIKBARI, R.; MACKAY, D.R. Skin Grafts. *Oper. Techn. Gen. Surg.*, v.8, p.197-206, 2006.
- MOHAMMADI, A.A.; SEYED, J.S.M.; KIASAT, M.; TAVAKKOLIAN, A.R. *et al.* Effect of fresh human amniotic membrane dressing on graft take in patients with chronic burn wounds compared with conventional methods. *Burns*, v.39, p.349-353 2013.
- NAKAMURA, T.; ENDO, K.I.; COOPER, L.J.; FULLWOOD, N.J. *et al.* The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.44, p.106-116, 2003.
- NIKNEJAD, H.; PAEINI-VAYGHAN, G.; TEHRANI, F.A.; KHAYAT-KHOEI M. *et al.* Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta*, v.34, p.340-345, 2013.
- PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed. Laser Surg.* v.28, p.291-325, 2010.
- POSTEN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S.; ARNDT, K.A. *et al.* Low level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.*, v.31, p.334-340, 2005.
- ROBSON, M.C.; KRIZEK, T.J. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann. Surg.* v.177, p.144-149, 1973.
- SOFT, STAT. Inc.. 2004. STATISTICA (Data Analysis Software System). versão 7. Online at: www.statsoft.com.
- SUBRAHMANYAM, M. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. *British journal of plastic surgery*, v. 48, p.477-478, 1995.
- TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J. Pharmacol. Sci.*, v.105, p.215-219, 2007.
- TONG, T.; SIMPSON, D.J. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. *J. Small Anim. Pract.*, v.53, p.520-525, 2012.
- TRELLES, M.A.; MAYAYO, E.; MIRO, L.; RIGAU, J. *et al.* The action of low reactive Level Laser Therapy (LLLT) on mast cells: a possible relief mechanism examined. *Laser Ther.* v.1, p.27-30, 1989.
- WHINFIELD, A.L.; AITKENHEAD, I. The light revival: does phototherapy promote wound healing? A review. *Foot*, v.19, p.117-124, 2009.