

Análises macro e microscópicas de enxertos cutâneos por semeadura após laserterapia de baixa intensidade

Macro and microscopic analysis of island skin grafts after low-level laser therapy

ELISÂNGELA BARBOZA DA SILVA¹; CINTIA LÚCIA MANISCALCO²; GREYSON VICTOR ZANATTA ÉSPER³; RICARDO ROMÃO GUERRA⁴; IVO I. KERPPERS⁵

R E S U M O

Objetivo: observar se a laserterapia de baixa intensidade acelera o processo inflamatório, a cicatrização e epitelização de enxertos cutâneos por semeadura. **Métodos:** vinte ratos foram submetidos a esta técnica de enxertia e divididos em dois grupos iguais, um tratado com laser e outro controle. **Resultados:** houve menor tempo de reação inflamatória, maior velocidade de cicatrização, epitelização e queratinização nos animais tratados com laser em relação aos não tratados. **Conclusão:** a laserterapia de baixa intensidade é efetiva no auxílio ao tratamento de enxertos por semeadura.

Descritores: Transplante autólogo. Transplante de pele. Cicatrização. Terapia a laser de baixa intensidade. Cirurgia Veterinária.

INTRODUÇÃO

Os enxertos de pele são alternativas para o fechamento de lesões extensas onde a reaproximação dos bordos não é possível. Eles se tornam efetivos quando o transplante cicatriza na sua nova localização. 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 lesão¹. Os autoenxertos apresentam maior êxito, uma vez que o enxerto e o hospedeiro são imunologicamente idênticos².

Os enxertos podem ser coletados com uma lâmina de bisturi ou com um perfurador de biópsia chamado "punch" e como são pequenos e circulares formam ilhas epitelizadas em leito com tecido de granulação³.

A biomembrana natural de látex é fina, elástica e de fácil manuseio, possui fina camada de polilisina que aumenta a permeabilidade e o fluxo microvascular⁴. Tem ainda comprovada biocompatibilidade e baixo custo em comparação com as outras alternativas encontradas no mercado⁵⁻⁹. Sua microarquitetura particular permite aderência proteica e celular, em especial os macrófagos envolvidos na reparação^{5,6,10}.

Pesquisas atuais mostraram que aplicação do laser de baixa intensidade em doses e exposições adequadas e 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 celular¹¹.

Os efeitos terapêuticos da laserterapia de baixa intensidade foram mostrados em estudos *in vitro* e *in vivo* e incluíram regeneração, efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. Outros estudos observaram ganhos na microcirculação local¹², sistema linfático¹³ e síntese de colágeno pelos fibroblastos^{13,14} e na prevenção de infecções¹⁵⁻¹⁷.

Outro trabalho, também mostrou que a irradiação de laser de baixa intensidade 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 extracelular¹⁸.

Em relação à ação anti-inflamatória, foi confirmado que o uso do laser promove rápida iniciação e resolução da fase inflamatória e da reparação tecidual, fazendo-a mais aguda e acentuada, além disso, aumenta a síntese de colágeno^{19,20}. Entretanto não comprovaram a ação anti-inflamatória do laser e sim que ele acelera esse processo, e também promove qualidade histológica ao tecido reparado e ainda ativação dos queratinócitos²¹.

Na intenção de se obter melhor resultado com relação ao processo cicatricial, este trabalho teve por obje-

Trabalho realizado no Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais - UESC, Ilhéus-BA.

1. Professora Assistente, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais – UESC-Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA; 2. Professora Adjunta, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – UNESP – Jaboticabal – SP; 3. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo-SP; 4. Professor Adjunto, Departamento de Ciências Agrárias – UFPB, Areia-PB; 5. Professor Assistente, Departamento de Fisioterapia - UNICENTRO, Guarapuava-PR.

tivo verificar se a aplicação do laser de baixa intensidade HeNe acelera o processo de cicatrização de enxertos cutâneos por sementeira.

MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo CEBEA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – São Paulo (UNESP/JABOTICABAL), sendo aprovado pela Comissão de ética e bem estar animal – CEBEA da Universidade Estadual Paulista – Unesp campus Jaboticabal sob o protocolo n. 010004-08.

Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos jovens (média de idade de 20 dias), com peso variando entre 200 e 300g. Foram separados aleatoriamente em dois grupos iguais (n=10), um controle (GC) que não sofreu nenhum tipo de tratamento e outro laser (GL) que recebeu aplicações de laser sobre a ferida. Os dois grupos foram submetidos à operação para criar um defeito na pele. Sob anestesia geral, com Isoflurano em máscara, a ferida foi criada com o auxílio de um bisturi e uma tesoura e tinham dimensão de aproximadamente 4x4cm. A biomembrana natural de látex com polilisina 1% (Isoforine – Cristália) foi utilizada como curativo e os animais receberam ainda uma bandagem com faixa de crepe e esparadrapo que foi trocada após cinco dias. No pós-operatório imediato foi administrado por via intramuscular em dose única 0,02ml de enrofloxacin 10% (Iflox 10% - Irfa) e 0,02ml de flunixin meglumine (Flumedin – Jofadel).

Após dez dias, em novo procedimento cirúrgico, todos os animais receberam os enxertos, também sob anestesia inalatória. Foi realizada tricotomia no flanco esquerdo, sítio doador. Os enxertos de espessura total foram colhidos com um *punch* cirúrgico de 5mm de diâmetro e enxertados em poços de 4mm de diâmetro criados no leito receptor coberto por tecido de granulação. Os sítios doadores cicatrizaram por segunda intenção.

O GL (n=10) recebeu no pós-operatório imediato, 72 horas depois e no sétimo dia, irradiação com laser de baixa intensidade 6J/cm²/18s em cada ponto enxertado. O GC (n=10) não recebeu irradiação.

Nas datas definidas para aplicações do laser de baixa intensidade no GL, também foram feitas as trocas de curativos do GC. Dois animais de cada grupo (GC e GL) foram sacrificados em câmara de CO₂ nos tempos um, dois, quatro, oito e 14 dias após a segunda intervenção cirúrgica, e, logo após o sacrifício, foram colhidas as amostras que abrangiam os enxertos e parte do leito receptor que foram identificadas e conservadas em formol a 10%.

O material conservado foi processado em laboratório e emblocado em parafina e cortados conforme os métodos histológicos de rotina. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e Tricômio de Masson. As lâminas foram analisadas e fotografadas em aumento de

100X em microscópio óptico acoplado a uma câmera. As imagens foram transferidas e processadas em um computador.

RESULTADOS

A avaliação macroscópica do grupo controle evidenciou que um dia após a primeira aplicação do laser de baixa intensidade, a ferida estava com aspecto hemorrágico, principalmente ao redor dos sítios receptores dos enxertos (Figura 1 A1). No segundo dia, houve diminuição da hemorragia, mas havia edema e secreção amarelada recobrendo todo o local (Figura 1 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 1 C1). Oito dias após o procedimento cirúrgico, o tecido de granulação se encontrava bem avermelhado, com menor área e aspecto ressecado



Figura 1 - 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 controle; 2 grupo laser. Os símbolos inseridos nas imagens significam respectivamente: Seta - área reepitelizada; (*) - zonas de retração cicatricial.

na sua superfície. Os sítios receptores já estavam margeando as bordas (Figura 1 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 epiteliação nas bordas estavam presentes (Figura 1 E1).

A avaliação macroscópica do grupo laser mostrou que no primeiro dia de pós-operatório, a ferida tinha aspecto hemorrágico, embora visualmente em menor intensidade do que a do grupo controle (Figura 1 A2). Após dois dias, o tecido de granulação avermelhado apresentava pequenas petéquias hemorrágicas (Figura 1 B2). Com três dias, a área do leito receptor estava menor, mais pálida e com secreção serosa (Figura 1 C2). No oitavo dia, iniciou-se a epiteliação das bordas e, embora diminuída, a ferida não tinha sinais de retração cicatricial (Figura 1 D2). Aos 14 dias, a cicatrização estava quase completa. Os enxertos estavam circundados pelo tecido re-epitelizado e pela pele íntegra adjacente à ferida. Apenas uma pequena área no centro do leito receptor não tinha aspecto epiteliação (Figura 1 E2).

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

Na avaliação microscópica, a coloração com hematoxilina-eosina evidenciou que é possível visibilizar a região do enxerto e seu leito receptor formado pelo tecido de granulação, conforme visto na figura 2 com aumento de 100X. Nos tempos um e dois dias se pode observar presença de infiltrado inflamatório com aspecto mais intenso no grupo controle. Aos quatro dias não há infiltrado inflamatório no grupo laser, e no grupo controle ele já está atenuado. Com oito dias, nota-se 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.

A partir do 8º dia, no grupo laser a área de transição entre o enxerto e o leito receptor está pouco evidente; já no grupo controle essa condição só pode ser vista na imagem referente aos 14 dias.

A coloração com tricômio de Masson foi utilizada para destacar a camada de epitélio e queratina na superfície do enxerto. A figura 3 é a prancha com os cortes histológicos no aumento de 100X. Nela pode se visibilizar que há aumento na proporção de colágeno em todos os tempos do GL (letras B, D, F, H e J) em relação ao GC (letras A, C, E, G e I). Nos dois grupos a queratina recobre a região do enxerto. A partir do oitavo dia ela aparece sobre o leito receptor de GL (Figura 3, H). No GL já se observavam papilas dérmicas no 14º dia (Figura 3, J) e a partir de quatro dias, a queratina já cobria o tecido de

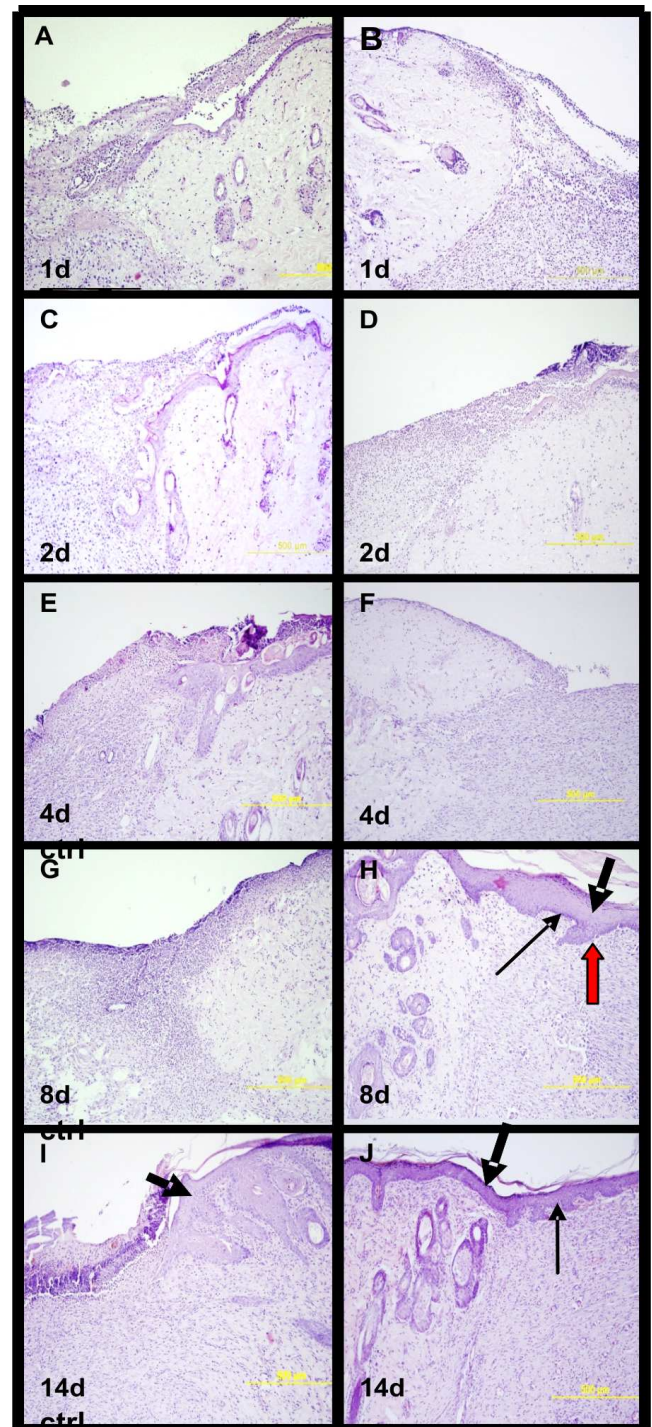


Figura 2 - Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração HE, aumento de 100X nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: seta grossa, epitélio; e seta fina, papilas dérmicas; seta cinza: crista epidérmica.

granulação (Figura 3, F). No GC a camada de queratina foi notada sobre o tecido adjacente aos 14 dias e, neste período o epitélio estava somente na região enxertada (Figura 3, I).

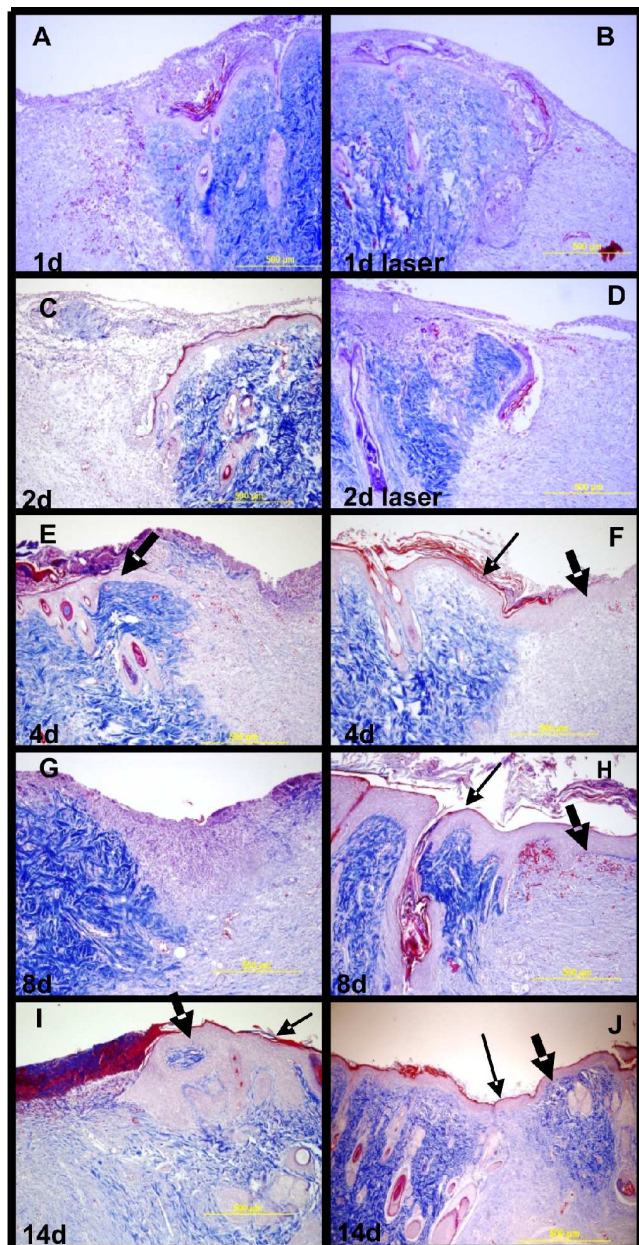


Figura 3 - Fotomicrografias dos cortes histológicos dos enxertos por sementeira na coloração Tricômio de Masson, aumento de 100X, nos diferentes tempos e grupos. Os símbolos inseridos nas imagens significam: seta grossa, epitélio; e as setas finas apontam a camada de queratina.

DISCUSSÃO

A biomembrana natural de látex que tem grande potencial de reparação e formação tecidual⁹. O curativo realizado com este material na primeira fase do trabalho garantiu uma rápida granulação da área e também um tecido de granulação de boa qualidade⁹ para ser o leito receptor dos enxertos.

Quanto à ação anti-infecciosa do laser^{15,16}, o resultado encontrado foi que o Grupo Controle apresentou

uma secreção amarelada com aspecto purulento sobre a ferida enxertada, fato este que não ocorreu no Grupo Laser, o que pode se relacionar com a ausência de infecção no grupo tratado com laser de baixa intensidade.

Os animais do GL não mostraram alteração comportamental, nem de ingestão de água e ração após os procedimentos cirúrgicos, isso poderia sugerir a ação analgésica do laser¹², mas aqueles do GC também não se alteraram; portanto este parâmetro deve ser investigado de maneira mais específica, como a dosagem de substâncias endógenas, por exemplo o cortisol, que fornece valores mais específicos para isso.

O GC com quatro dias, ao contrário do GL, apresentava ferida mais avermelhada indicando a presença de inflamação, este resultado foi também percebido nos cortes histológicos com coloração de hematoxilina e eosina, onde o infiltrado inflamatório pode ser visibilizado. Este tipo de resposta caracteriza a ação do laser como aceleradora do processo inflamatório¹⁹ e não como anti-inflamatória^{12,18}.

Visto que a cicatrização é um processo complexo que se inicia com a reação inflamatória, a afirmação que explica melhor a ação do laser em relação à diminuição do tempo de cicatrização é que quanto mais rápido cessar a fase inflamatória¹⁹, mais rapidamente se inicia a fase reparadora e mais cedo a cicatrização se dá por completo, como ocorreu neste estudo, onde o GL aos 14 dias estava com a ferida cicatrizada, enquanto o GC ainda se encontrava no início da epitelização. Este resultado já foi relatado em outro trabalho em que o laser acelerou a primeira e a segunda fase do processo cicatricial²⁰.

Tanto a avaliação macro como a microscópica mostrou que os animais do GL apresentaram epitelização da ferida em menor tempo do que os do GC, isso se deve ao aumento da proliferação celular¹¹ induzida pelo laser de baixa intensidade.

A literatura relata a boa qualidade do tecido cicatricial após a laserterapia¹⁹, o que foi comprovado na leitura das lâminas referentes ao 14º dia do GL. Ao contrário do GC, nelas foram observadas papilas dérmicas, o que revela um alto grau de organização tecidual e com isso a qualidade do reparo visto que essas estruturas têm a função de fixação do epitélio ao tecido de granulação.

Os cortes histológicos do GL corados com Tricômio de Masson, demonstraram a presença de queratina sobre a ferida a partir do quarto dia, devido a ação ativadora que o laser de baixa intensidade tem sobre os queratinócitos²¹. O GC só apresentou a cobertura de queratina sobre o leito receptor a partir do 14º dia, já que não recebeu a irradiação.

Em conclusão, os enxertos foram incorporados e iniciaram a epitelização do leito receptor mais rapidamente no grupo irradiado com o laser. A cicatrização da ferida tratada com o laser foi mais rápida e teve melhor aspecto macro e microscópico no grupo tratado com o laser de baixa intensidade quando comparado ao grupo que não recebeu a laserterapia como tratamento.

A B S T R A C T

Objective: To observe the effects of low intensity laser therapy in inflammation, wound healing and epithelialization of island skin grafts. **Methods:** Twenty rats were subjected to this grafting technique and divided subsequently into two equal groups, one treated with laser and the other control. **Results:** there was less inflammation, faster healing, epithelialization and keratinization in the laser-treated animals when compared to the untreated. **Conclusion:** Low intensity laser therapy is helpful to island skin grafting.

Key words: Autologous transplantation. Skin transplantation. Healing. Laser therapy of low intensity. Veterinary Surgery.

REFERÊNCIAS

- Rudolph R, Ballantyne Jr DL. Skin grafts. In: McCarthy JG, May Jr JW, Litter JW, editors. Plastic surgery. Philadelphia: Saunders; 1990. p.221-74.
- Pope ER. Skin grafting in small animal surgery. Part I. The normal healing process. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1988;10(8):915-23.
- Swain SF. Enxertos Cutâneos. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2ª ed. São Paulo: Manole; 1998. p.402-19.
- Pinho ECCM, Sousa SJF, Schaud F, Lachat JJ, Coutinho-Netto J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. *Arq Bras Oftalmol.* 2004;67(1):27-32.
- Mrué, F. Substituição de esôfago cervical por prótese biossintética de látex – estudo experimental em cães [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996.
- Mrué F. Neoformação tecidual induzida por Biomembrana® de látex natural com polilisina – aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal – Estudo experimental em cães [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2000.
- Potério-Filho J, Silveira SAF, Potério GMB, Mrué F, Coutinho-Netto J. O uso do látex natural com polilisina 0,1% na cicatrização de úlceras isquêmicas. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Angiologia e Cirurgia Vascular, 1999; São Paulo: Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular; 1999. p. 156. (Rev Bras Angiol Cir Vasc; vol.15,)
- Frade MA, Valverde RV, de Assis RV, Coutinho-Netto J, Foss N. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Int J Dermatol.* 2001; 40(3): 238-40.
- Silva EB. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com fenda palatina experimentalmente induzida [dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2006.
- Thomazini JA, Mrué F, Coutinho-Netto J, Lachat JJ, Ceneviva R, Zborowski AC, et al. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. *Acta Microscopica.* 1997;6(Suppl. B):798-9.
- Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):705-14.
- Maier M, Haina D, Landthaler M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Med Science.* 1990;5(4):381-6.
- Reedy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing in rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998;22(5):281-7.
- Carvalho PTC, Mazzer N, Barbieri CH. Morphometric analysis of the percentage of collagen and number of macrophage highlighted by immunohistochemistry, in cutaneous wounds the rats diabetic and non-diabetic treated through HeNe laser. *Lasers Med Sci.* 2003;18(Suppl 1):S54-5.
- Karu T. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: Simunovic Z, editor. Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low-energy level laser therapy – LLLT. Rijeka: Vitagraf; 2000. p. 227-42.
- Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med.* 2000;26(1):41-7.
- do Nascimento PM, Pinheiro AL, Salgado MA, Ramalho LM. 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: histological study in rats. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(6):513-8.
- de Araújo CE, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TM. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B.* 2007;86(2):87-96.
- Viegas VN, Aberu ME, Viezzer C, Machado DC, Filho MS, Silva DN, et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(6):467-73.
- De Oliveira RF, Oliveira DA, Monteiro W, Zangaro RA, Magini M, Soares CP. Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):6-9.
- Posten W, Wronde DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31(1):334-40.

Recebido em 03/06/2012

Aceito para publicação em 01/08/2012

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Silva EB, Maniscalco CL, Esper GVZ, Guerra RR, Kerppers II. Análises macro e microscópicas de enxertos cutâneos por sementeira após laserterapia de baixa intensidade. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2013; 40(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Elisângela Barboza da Silva

E-mail: elisangelavet@yahoo.com.br