

ELIANA FERREIRA RIBEIRO DURÃES

**EFEITOS DA CARBOXITERAPIA NA INTEGRAÇÃO DE ENXERTOS
CONDROCUTÂNEOS EM COELHOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de
Brasília como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre.**

Área de concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Brasília-DF

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

ELIANA FERREIRA RIBEIRO DURÃES

EFEITOS DA CARBOXITERAPIA NA INTEGRAÇÃO DE ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS EM COELHOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: -----
Prof. Dr. João Batista de Sousa – Faculdade de Medicina –
UnB

Examinadores: -----
Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira – Faculdade de
Medicina – UnB

Prof. Dr. Jefferson Lessa Soares de Macedo – Secretaria de
Estado de Saúde do Distrito Federal, SES-DF, Brasil

Suplente: -----
Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro – Faculdade de Medicina -
UnB

A Deus que está sempre presente.

Ao meu amor Leonardo, meu marido, amigo e companheiro.

Aos meus filhos, Fernando, Ana e Giovana por fazerem
minha vida especial.

Ao meu pai, Tarcísio, pelos bons exemplos, pela minha
formação, pela presença constante.

À minha mãe, Eliana, por todo o amor e carinho, sempre.

À minha sogra, Eliane, pelo apoio e ajuda constantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho, especialmente:

Ao Professor Doutor João Batista de Sousa, pela orientação, pela paciência e por acreditar sempre na minha capacidade.

À equipe do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela ajuda no cuidado dos animais. Às veterinárias Uyara Rennó Arruda, Raquel Falcão de Freitas Bubniak e Gabriela Mariângela Farias de Oliveira, pelas anestésias dos animais e ajuda durante o experimento.

Ao funcionário José Tavares dos Santos, pelo cuidado com os animais e empenho em conseguir gaiolas apropriadas.

À Professora Doutora Fabiana Pirani Carneiro pela confecção das lâminas, análise histológica, fotografias das lâminas de histologia e orientação.

Ao Professor Doutor Ruy de Souza Lino Júnior, por sua orientação e análise qualitativa do colágeno.

Ao Professor Leonardo de Castro Durães, meu marido, pela ajuda e orientação na análise estatística.

À aluna de enfermagem e enfermeira técnica Élide Cristina da Costa Gonçalves, pelo auxílio nas operações.

À amiga Patrícia Ferreira pelos artigos que serviram de referência para este trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação e a todos os professores que ao longo da minha vida contribuíram para o que sou hoje.

Aos colegas da Pós-Graduação pelas experiências trocadas e incentivo.

À UnB, pela oportunidade de realizar este sonho.

À Capes pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

Há duas formas para viver a sua vida: Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é achar que todas as coisas são um milagre.

Fernando Pessoa

RESUMO

O enxerto condrocútâneo é uma boa opção para reconstrução, principalmente da asa nasal. Um dos fatores que limita o uso deste enxerto é o seu diâmetro máximo em torno de 1,5 cm. A carboxiterapia é o uso terapêutico do gás carbônico por via subcutânea e tem sido usada para melhorar a perfusão tecidual, aumentar o fluxo sanguíneo e acelerar a cicatrização. A necessidade de tratamentos que aumentassem as chances de pega dos enxertos compostos e a divulgação da carboxiterapia como medida que aumenta a microcirculação e a oxigenação, podendo facilitar a integração dos enxertos levaram à proposição deste trabalho. O objetivo deste trabalho é estudar os possíveis efeitos da carboxiterapia na integração de enxertos condrocútâneos em coelhos. Foi feito um estudo experimental utilizando 20 coelhos que foram distribuídos em um grupo submetido a carboxiterapia e outro à infiltração de solução cloreto de sódio a 0,9%. Em cada orelha foi feito um enxerto circular de 1,5 cm ou 2 cm de diâmetro. Foram analisadas a evolução clínica dos animais, a pega dos enxertos, a quantidade e o tipo de colágeno por histomorfometria, a histopatologia incluindo a neovascularização, fibroblastos, células mononucleares, hiperplasia epitelial, folículos pilosos viáveis, necrose da cartilagem e ulceração da pele. O grupo submetido a carboxiterapia teve um ganho de peso significativamente menor que os animais do grupo submetido à infiltração de solução salina ($p=0,038$). Na análise do enxerto, não foram observadas diferenças histopatológicas entre os grupos. A carboxiterapia não influenciou a pega dos enxertos de 1,5 cm ou 2 cm, $p = 0.567$ e 0.777 , respectivamente. Houve aumento da quantidade de colágeno nos enxertos de 2 cm nos coelhos submetidos a carboxiterapia ($p=0,003$). O efeito da carboxiterapia não foi significativamente diferente da infusão de solução salina na integração de enxertos condrocútâneos realizados em orelhas de coelhos.

Palavras chave: Carboxiterapia. Enxertos Compostos de Cartilagem. Enxerto Auricular. Enxerto Condrocutâneo. Dióxido de carbono. Carboinsuflação

ABSTRACT

Chondrocutaneous graft is an effective option for reconstruction, especially of the nasal alae. The limiting factor for its use is the maximum diameter of 1.5 cm. Carboxitherapy comprises subcutaneous use of carbon dioxide aiming to improve tissue perfusion, increase blood flow and speed healing. The need for a treatment strategy to increase composite graft survival and the possibility of improving microcirculation and oxygenation with the use of carbon dioxide therapy that could make survival of larger grafts possible led us to this study. The objective was to evaluate the effect of carboxytherapy in auricular composite grafts. An experimental study was conducted using 20 rabbits randomly assigned to a treatment group of carbon dioxide therapy or a control group of sodium chloride solution at 0,9%. In each ear a circular graft with a 1,5 cm or 2 cm of diameter was amputated and reattached. The animals underwent carbon dioxide therapy or saline solution injection four times during the experiment. We analyzed clinical evolution of animals, grafts survival, the amount and type of collagen by histomorphometry, histopathology including neovascularization, collagen, fibroblasts, mononuclear cells, epithelial hyperplasia, viable hair follicles, necrosis of cartilage and skin ulceration. The treated group had a significantly lower weight gain than control group ($p=0,038$). Histopathology of grafted area was not significantly different between groups. Carboxytherapy didn't influence graft survival rate for 1.5cm or 2 cm grafts, $p = 0.567$ and 0.777 respectively. There was an increase in amount of collagen in 2 cm grafts submitted to carbon dioxide therapy ($p=0,003$). Carboxytherapy was not significantly different from saline infusion on auricular composite graft survival.

Keywords: Carboxitherapy. Auricular Composite Grafts. Carbon Dioxide. Composite Chondrocutaneous Graft

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO, O COELHO.....	21
FIGURA 2-	GAIOLAS NO ALOJAMENTO ONDE OS ANIMAIS FORAM MANTIDOS DURANTE TODO O EXPERIMENTO.....	22
FIGURA 3-	GAIOLA INDIVIDUAL COM ÁGUA E RAÇÃO ABRIGANDO UM DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO.....	23
FIGURA 4-	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
FIGURA 5-	IDENTIFICAÇÃO DO COELHO 8 TRATADO COM CARBOXITERAPIA.....	25
FIGURA 6-	REALIZAÇÃO DA TRICOTOMIA NA ORELHA DIREITA DO COELHO NÚMERO 4.....	26
FIGURA 7-	INSUFLADOR DE CO ₂ CARBTEK ACOPLADO AO CILINDRO DE CO ₂ MEDICINAL, USADOS NO EXPERIMENTO.....	27
FIGURA 8-	REALIZAÇÃO DA CARBOXITERAPIA NA ORELHA DIREITA DO COELHO 13 DOIS DIAS ANTES DA OPERAÇÃO.....	28
FIGURA 9-	“PUNCH” DE 2 CM DE DIÂMETRO USADO PARA A RETIRADA DOS ENXERTOS DESTE TAMANHO.....	29
FIGURA 10-	DETALHE DA VASCULARIZAÇÃO DAS ORELHAS QUE ERA OBSERVADO NA ESCOLHA DO LOCAL DE RETIRADA DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS.....	29
FIGURA 11-	ENXERTOS NA POSIÇÃO FINAL, SUTURA MANTENDO FIOS LONGOS NOS PONTOS CARDEAIS PARA A FIXAÇÃO DOS CURATIVOS.....	30
FIGURA 12-	COELHO 8 COM O CURATIVO ATADO E O COLAR ELIZABETANO ADAPTADO.....	31
FIGURA 13-	COELHO 11 NA GAIOLA, COM O COLAR ADAPTADO.....	32
FIGURA 14-	FOTOGRAFIA DAS ORELHAS DO COELHO 8 NO 21º. DIA PÓS OPERATÓRIO AINDA COM A CROSTA SOBRE A FERIDA.....	34
FIGURA 15-	ORELHA DIREITA DO COELHO 14 FIXADA NA PLACA DE PAPELÃO, JÁ REALIZADA A RETIRADA DAS CROSTAS.....	35

FIGURA 16-	EXEMPLO DO PROCESSO DE CÁLCULO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO PRESENTE NAS LÂMINAS. NO SENTIDO HORÁRIO TEMOS: FOTOGRAFIA DA LÂMINA; MARCAÇÃO DA ÁREA A SER ANÁLISADA; EXCLUSÃO DO RESTANTE DA IMAGEM; INVERÇÃO DA ÁREA. ABAIXO, RESULTADO OBTIDO PELO IMAGE J NIH@.....	37
FIGURA 17-	FOTOGRAFIA DA PEÇA CIRÚRGICA DA ORELHA DIREITA DO COELHO 16 USADA PARA O CÁLCULO DA ÁREA DE PEGA DO ENXERTO.....	38
FIGURA 18-	EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO: PADRONIZAÇÃO DA ESCALA DA FOTOGRAFIA DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.....	39
FIGURA 19-	EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO: DELIMITAÇÃO E MEDIDA DA ÁREA TOTAL DO ENXERTO DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.....	39
FIGURA 20-	EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO: DELIMITAÇÃO E MEDIDA DA ÁREA DE PEGA PARCIAL DO ENXERTO DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.....	40
FIGURA 21-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO A PRESENÇA DE NEOVASOS NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 100X	51
FIGURA 22-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO A PRESENÇA DE COLÁGENO E FIBROBLASTOS NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 400X.....	52
FIGURA 23-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO HIPERPLASIA EPIDÉRMICA E FIBROSE DÉRMICA NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 40X.....	52
FIGURA 24-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO ULCERAÇÃO NA PELE DA ORELHA DIREITA DO COELHO 4 – AUMENTO DE 20X.....	53

FIGURA 25-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO NECROSE TOTAL DA PELE DA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 5 – AUMENTO DE 20X.....	53
FIGURA 26-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO NECROSE TOTAL DA PELE DA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 5 – AUMENTO DE 40X.....	54
FIGURA 27-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELO PICRO-SÍRIUS NA ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE A BORDA E O ENXERTO, NÃO POLARIZADA, MOSTRANDO O PONTO DE CORTE DA CARTILAGEM.....	56
FIGURA 28-	FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELO PICRO-SÍRIUS NA ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE A BORDA E O ENXERTO, POLARIZADA, MOSTRANDO O PONTO DE CORTE DA CARTILAGEM (FOTO FEITA NA MESMA LÂMINA DA FIGURA 16).....	56

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- PESO DOS COELHOS SUBMETIDOS A CARBOXITERAPIA OU SOLUÇÃO SALINA, NO INÍCIO DO EXPERIMENTO E NO DIA DA EUTANÁSIA. NA COMPARAÇÃO DO GANHO DE PESO ENTRE OS GRUPOS, $p=0,038$. VALORES EM GRAMAS.....	42
GRÁFICO 2- PERCENTUAL DE PEGA TOTAL DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO NA PARTE INTERNA DA ORELHA DO COELHO DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA E CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO.....	43
GRÁFICO 3- PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA E O TAMANHO DO ENXERTO.....	44
GRÁFICO 4- PERCENTUAL DE PEGA TOTAL DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO AVALIADO NA FACE INTERNA COMPARADO COM O PERCENTUAL AVALIADO NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS.....	45
GRÁFICO 5- INFLUENCIA DO TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO NOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS, AVALIADOS NA FACE INTERNA E EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS. NA FACE INTERNA, $p=0,001$; NA FACE EXTERNA, $p=0,008$	46
GRÁFICO 6- PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	48
GRÁFICO 7- PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	48
GRÁFICO 8- COMPARAÇÃO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS QUANDO AVALIADOS NA FACE INTERNA OU EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS.....	49

GRÁFICO 9- ÁREAS TOTAIS DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADAS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	50
GRÁFICO 10-ÁREAS TOTAIS DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADAS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	50
GRÁFICO 11-PERCENTUAIS DE COLÁGENO CALCULADOS NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS CONFORME O USO DA CARBOXITERAPIA OU DA SOLUÇÃO SALINA.....	57
GRÁFICO 12-MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO PRESENTE NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES.....	58
GRÁFICO 13-MÉDIA E VALORES INTERVALARES DA QUANTIDADE DE COLÁGENO EM CADA ÁREA CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	58
GRÁFICO 14-MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO.....	59
GRÁFICO 15-MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS DIFERENTES ÁREAS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO.....	60
GRÁFICO 16-MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICROSIRIUS NOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS DE 1,5 CM E 2 CM DE DIÂMETRO CONFORME O USO DE CARBOXITERAPIA OU SOLUÇÃO SALINA.....	60
GRÁFICO 17-COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS DE 2 CM CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	61

GRÁFICO 18-COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PERCENTUAL DO COLÁGENO NAS
LÂMINAS CORADAS PELO PÍCRO-SÍRIUS NAS DIFERENTES
LOCALIZAÇÕES DOS ENXERTOS CONDRÓCUTÂNEOS DE 1,5 CM,
CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DO PESO DOS ANIMAIS, NOS DOIS GRUPOS, NO INÍCIO DO EXPERIMENTO E NO DIA DA EUTANÁSIA.....	41
TABELA 2-	MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	43
TABELA 3-	MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	44
TABELA 4-	MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	47
TABELA 5-	MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	47
TABELA 6-	VALOR DE “ <i>p</i> ” ENCONTRADO NA COMPARAÇÃO DOS DADOS HISTOLÓGICOS ENTRE OS GRUPOS CX SS.....	54
TABELA 7-	TIPO DE COLÁGENO PREDOMINANTE NAS LÂMINAS CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.....	55
TABELA 8-	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA QUANTIDADE DE COLÁGENO NAS DIFERENTES ÁREAS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODO	21
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	21
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	23
3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS E OPERATÓRIOS.....	25
3.4.1 Considerações gerais.....	25
3.4.2 Anestesia.....	26
3.4.3 Carboxiterapia/infiltração de solução salina 2 dias antes da operação.....	26
3.4.4 Descrição do ato operatório.....	28
3.4.5 Evolução pós-operatória.....	31
3.4.6 Retirada dos curativos e carboxiterapia/infiltração de solução salina no 5 ^o DPO.....	32
3.4.7 Carboxiterapia/Infiltração de solução salina no 12 ^o DPO.....	33
3.4.8 Eutanásia.....	33
3.4.9 Estudo histopatológico.....	35
3.4.10 Estudos histomorfométricos do colágeno.....	36
3.4.11 Avaliação da pega do enxerto.....	37
3.4.12 Análise Estatística.....	40
4 RESULTADOS	41
4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	41
4.2 PESO DOS ANIMAIS.....	41
4.3 ANÁLISE DA PEGA DO ENXERTO.....	42
4.3.1 Percentual de pega total do enxerto.....	42
4.3.2 Percentual de pega total somado ao percentual de pega parcial.....	46
4.3.3 Área total do enxerto.....	49
4.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	51
4.5 ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO COLÁGENO.....	55
4.5.1 Estudo qualitativo do colágeno.....	55
4.5.2 Estudo quantitativo do colágeno.....	55
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICES	71
ANEXO	100

1 INTRODUÇÃO

Enxertos correspondem ao transplante onde é feita a retirada completa de parte de um tecido e sua transferência para outro lugar do corpo (leito receptor). Ele é chamado de auto-enxerto, quando o doador e o receptor são o mesmo indivíduo. Eles podem ser classificados quanto a sua espessura, total ou parcial. Podem ser, ainda, simples, quando constituídos de um único tecido, ou compostos, quando associados a outro tecido histologicamente diferente. A integração de um enxerto depende do rápido restabelecimento de uma circulação adequada e pode ser dividida em três fases: fase da embebição plasmática, primeiras 48 horas, quando a nutrição do enxerto é proveniente do plasma do leito receptor; fase vascular, após 48 horas, a nutrição é feita através dos condutores vasculares estabelecidos entre o enxerto e o leito, iniciando-se o fluxo sanguíneo; e fase de neovascularização, com a formação de novos capilares entre o leito receptor e o enxerto e a neoformação de linfáticos (DOCKHORN, L.F.; ZANINII, S.A.; MÉLEGA, J.M., 1992).

Os enxertos compostos são definidos como sendo a transferência de um conjunto de tecidos histologicamente diferentes, porém, interconectados anatomicamente. O tipo mais comum de transferência empregado é o enxerto composto de pele e cartilagem da orelha, enxerto condrocútâneo, que consiste num segmento de cartilagem auricular coberto de um ou de ambos os lados por pele (ISHIDA, J.; SHIROMA, E.H., 1992).

O enxerto composto de cartilagem é uma opção valiosa usada na reconstrução de áreas difíceis como a asa nasal, pois reconstrói a região de forma tri-dimensional. Enxertos compostos de cartilagem auricular têm sido usados por mais de 100 anos. Um dos fatores que limita o uso deste enxerto é o seu diâmetro máximo em torno de 1,5 cm para enxertos de espessura total, tornando-o uma alternativa somente em reconstruções de defeitos até este tamanho (LEWIS, D.; GOLDZTEIN, H.; DESCHLER, D., 2006). Além da indicação para a reconstrução de perda parcial da asa nasal, pode ser usado para reconstrução de defeitos da ponta nasal, columela, fossa nasal, filtro labial em fissurados e nas reconstruções do tarso nas perdas palpebrais (ISHIDA, J.; SHIROMA, E.H., 1992).

O coelho pode ser uma boa opção para o estudo do enxerto composto auricular, por ser um modelo animal bem definido e apresentar arelhas de tamanho adequado para o experimento (LI, E.N.; MENON, N.G.; RODRIGUES, E.D., 2004).

A carboxiterapia é o uso terapêutico do gás carbônico por via subcutânea. O efeito dessa administração é efetivo não apenas na melhora dos parâmetros da circulação e perfusão tecidual local, mas também induzindo um aumento da pressão parcial de oxigênio tecidual

(FABRY, R. et al., 2009). Isso pode ser devido a hipercapnia induzida no fluxo sanguíneo capilar levando ao aumento do oxigênio local disponível, causado pelo aumento da liberação pela hemoglobina devido a redução no pH (Efeito Bohr) (ABRAMO, A.C., 2010; JENSEN, F.B., 2004). Brockow, T. et al. (2000) em um artigo de revisão, mostrou que a maioria da literatura existente até então, era em alemão, polonês ou russo. Naquela época, o mecanismo de ação proposto já era de uma hipercapnia e acidose no local da injeção, levando ao aumento na produção do ácido carbônico (HCO_3) e aumento do fluxo sanguíneo. Era conhecido o efeito analgésico da carboxiterapia e seu uso indicado no tratamento das arteriopatas periféricas, nas anginas estáveis, na enxaqueca e em doenças músculo-esqueléticas.

O uso do dióxido de carbono (CO_2) iniciou com os banhos de água carbonada em piscinas naturais, há registros da sua utilização terapêutica desde 1151. As indicações terapêuticas do CO_2 incluem doenças vasculares, cardíacas, metabólicas, reumáticas, celulite, úlceras crônicas, gordura localizada, enxaqueca, cicatrizes. Além de ser usado na radiologia como guia para colocação de cateteres e em cirurgias laparoscópicas para a visualização do campo cirúrgico (ABRAMO, A.C., 2010, BRANDI, C. et al., 2004; NACH, R. Et al., 2010). Banhos de imersão em água carbonada aumentam o fluxo sanguíneo nas regiões submersas, quando comparadas a água natural (HARTMANN, B.R., BASSENGE, E., PITTLER, M., 1997; SATO, M. et al., 2009).

O gás carbônico é atóxico, não embólico, amplamente empregado em medicina nas cirurgias laparoscópicas, histeroscopias e como meio de contraste em arteriografias e ventriculografias. O homem produz cerca de 200cc de CO_2 por minuto, quantidade que pode aumentar até 10 vezes durante esforços físicos, o volume terapêutico administrado nas sessões de carboxiterapia, em torno de 80 ml por minuto, encontra-se dentro do fisiológico (FRANCO, C.C., 2007). Sua segurança pode ser verificada no seu uso como coadjuvante na área de diagnóstico por imagem, como contraste e guia para inserção de cateteres e em cirurgias videoendoscópicas, nas quais, o volume de gás introduzido na cavidade abdominal pode chegar a 20.000 ml de CO_2 com fluxos de 1000 ml/min (ABRAMO, A.C., 2010).

A infusão do CO_2 desencadeia uma série de respostas: dilatação das arteríolas pré-capilares, aumento do fluxo sanguíneo tecidual, neovascularização, aumento da celularidade local, aumento da atividade fibrinogênica, remodelação do tecido conjuntivo e lise dos adipócitos. Tem sido utilizado na recuperação da elasticidade e resistência da pele, na redução de acúmulos localizados de gordura, na recuperação de tecido de granulação de feridas, como coadjuvante em cirurgias de rejuvenescimento facial e lipoaspiração e no tratamento de celulite e estrias cutâneas (ABRAMO, A.C., 2010; BRANDI, C. et al., 2001).

O uso do CO₂ nas úlceras vasculares e outras feridas crônicas dos membros inferiores e úlceras de pressão, reduzindo a área da ferida, melhorando a cicatrização das lesões e reduzindo a intensidade da dor, foi descrito (ABRAMO, A.C., 2010; ABRAMO, A.C.; TEIXEIRA, T.T., 2011; PIAZZOLLA, L., 2011; PIAZZOLLA, L. et al., 2012; BRANDI, C.; GRIMALDI, L.; NISI, G., 2010). ABRAMO, A.C. e TEIXEIRA, T.T. (2011), no estudo “Carboinsuflação em úlceras crônicas dos membros inferiores”, observaram aumento médio de 3,4 vezes no calibre dos vasos nos membros submetidos a carboxiterapia e aumento de 3,1 vezes no diâmetro das arteríolas pré capilares. Neste mesmo estudo, foi observado aumento no número de capilares entre a terceira e a décima aplicação, além de aumento nos macrófagos e fibroblastos. O aumento dos macrófagos ocorreu a partir da terceira sessão e diminuiu após a quinta, enquanto os fibroblastos apresentaram grande aumento após a quinta sessão. A somatória das respostas vasomotora e celular, estimuladas pela infusão controlada de CO₂, permitiu o fechamento espontâneo das úlceras de pequena extensão ou tornou-as aptas a receber o enxerto autólogo de pele, nas de média e grande extensão.

A carboxiterapia é um procedimento de custo baixo (PIAZZOLLA, L. et al., 2012), que requer um aparelho portátil e tem melhorado a micro circulação nas áreas onde é aplicada (BROCKOW, T. et al., 2000; ITO, T.; MOORE, J.I.; KOSS, M.C., 1989). Uma alternativa que comprovadamente favorece a integração dos enxertos compostos é a oxigenoterapia hiperbárica, mas, além de ter um custo elevado, não é facilmente encontrada, ficando reservada aos grandes centros (LEWIS, D.; GOLDZTEIN, H.; DESCHLER, D., 2006; LI, E.N.; MENON, N.G; RODRIGUES, E.D., 2004).

A intradermoterapia ou mesoterapia foi definida em 1952 por Pistor, que observou efeitos favoráveis com o uso de injeções de procaína em paciente surdo. Em 1964, foi criada a Sociedade Francesa de Mesoterapia. A intradermoterapia constitui-se em uma forma de administração de medicamentos, com injeções na derme ou hipoderme (MATARASSO, A.; PFEIFER, T.M., 2009). Há várias teorias para explicar o funcionamento da intradermoterapia. Foram descritos quatro fatores para explicar seu efeito: a ação da picada levando a estimulação tegumentar; o efeito mecânico provocado pela distensão, a composição do medicamento utilizado e a resposta de SNC com a estimulação nervosa (ARENA-DE-SOUZA, R.C.; CABRAL, R. M.; REIS, M., 2007).

Em 2011, o consenso da Sociedade Italiana de Mesoterapia definiu a mesoterapia ou intradermoterapia como injeção de fármacos ou substâncias bioativas em pequenas quantidades através de múltiplas punções realizadas nas áreas a serem tratadas. A intradermoterapia diminui a quantidade do fármaco necessário para tratar a patologia. A

intradermoterapia apresenta um duplo mecanismo de ação, além do efeito local do fármaco, o processo de introdução de agulhas na pele estimula uma ação reflexa levando a um aumento de endorfinas. Segundo este mesmo consenso, a intradermoterapia está indicada no tratamento da insuficiência veno-linfática crônica, no tratamento da dor locorregional crônica, na celulite, no rejuvenescimento facial e na vacinação (MAMMUCARI, M. et al., 2011).

O uso da intradermoterapia para finalidades cosméticas tem crescido muito nos últimos anos, sendo utilizada para tratamento da gordura localizada, celulite, estrias e rejuvenescimento facial. Apesar do uso frequente, faltam evidências científicas que suportem a sua utilização (MATARASSO, A.; PFEIFER, T.M., 2009; ATIYEH, B.S.; IBRAHIM, A.E.; DIBO, S.A., 2008; SARKAR, R.; GARG, V.K.; MYSORE, V., 2011).

O enxerto é um tecido que ao ser transportado depende do aporte de oxigênio e nutrientes do leito receptor para a sua sobrevivência, até que a neovascularização seja capaz de suprir as necessidades do tecido transplantado. Quanto menor o tamanho do enxerto maior a chance de integração (CONVERSE, M.J; UHLSCHMID, G.K.; BALLANTINE Jr, D.L., 1969). O enxerto composto de cartilagem é uma opção na reconstrução da asa nasal que pode resultar em uma excelente reconstrução, mas que apresenta altos índices de insucesso.

A necessidade de tratamentos que aumentassem as chances de integração dos enxertos compostos e a divulgação da carboxiterapia como medida que aumenta a microcirculação e a oxigenação, podendo facilitar a integração dos enxertos condrocútâneos levaram à proposição deste trabalho.

2 OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos da carboxiterapia na integração de enxertos condrocitâneos em coelhos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, com a colaboração do Laboratório de Patologia de Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

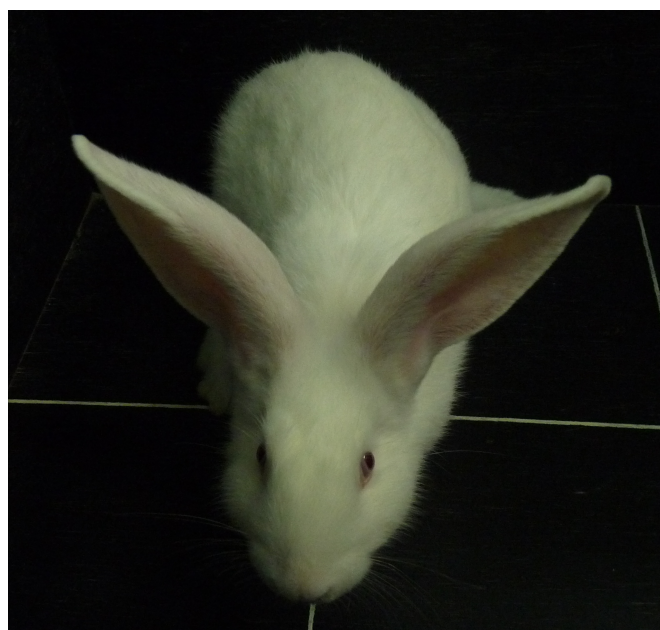
O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação animal – COBEA.

As normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 14724 foram usadas na redação deste trabalho.

3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, da linhagem New Zealand, com peso de 1400g a 3200g (Figura 1).

FIGURA 1 – ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO, O COELHO



FONTE: O autor (2012)

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com regime de doze horas de luz artificial e doze horas de escuro, no alojamento da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Figura 2).

FIGURA 2 – GAIOLAS NO ALOJAMENTO ONDE OS ANIMAIS FORAM MANTIDOS DURANTE TODO O EXPERIMENTO



FONTE: O autor (2012)

Todos os coelhos passaram por, no mínimo, 5 dias de aclimação. Durante todo o período em que permaneceram no alojamento, os animais tiveram livre acesso a água e ração própria para coelhos (Coelhão – Guabi Ltda) (Figura 3).

FIGURA 3 - GAIOLA INDIVIDUAL COM ÁGUA E RAÇÃO ABRIGANDO UM DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO



FONTE: O autor (2012)

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Com o intuito de avaliar o efeito isolado do CO₂, propusemos um grupo controle submetido a infiltração de solução de cloreto de sódio a 0,9%, para eliminar possíveis fatores de confusão que seriam: o efeito provocado pelas múltiplas punções e o efeito mecânico da distensão tecidual provocada pelo CO₂.

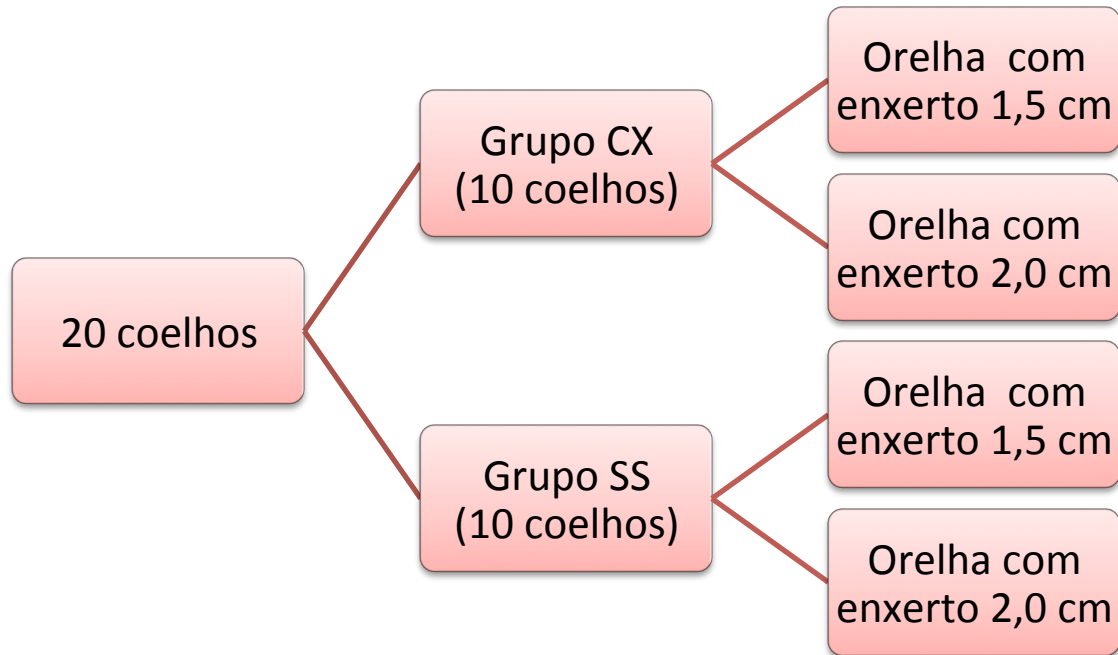
Os 20 coelhos foram distribuídos, aleatoriamente, em 2 grupos de 10 animais:

Grupo Carboxiterapia (CX) – Animais submetidos a enxerto condrocútâneo de 1,5cm de diâmetro em uma orelha e 2 cm de diâmetro na outra orelha e carboxiterapia nas duas orelhas, 2 dias antes, no dia da operação, no 5^o. dia pós operatório (DPO) e no 12^o. DPO.

Grupo Solução Salina (SS) – Animais submetidos a enxerto condrocútâneo de 1,5cm

de diâmetro em uma orelha e 2 cm na outra orelha e infiltração de solução de cloreto de sódio a 0,9% nas duas orelhas 2 dias antes, no dia da operação, no 5º. DPO e no 12º. DPO (Figura 4).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESENHO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2012)

As operações foram realizadas em agrupamentos de 4 animais, sendo dois de cada grupo. Foram confeccionados crachás de identificação que foram distribuídos aleatoriamente entre os coelhos no dia do primeiro procedimento. Além dos crachás, os animais foram identificados por numerais inscritos no dorso, utilizando marcador permanente.

Cada crachá trazia o número do coelho, o grupo ao qual ele pertencia (carboxiterapia ou solução salina), o tamanho do enxerto em cada orelha, e qual seria a primeira orelha a ser abordada (Figura 5).

FIGURA 5 - IDENTIFICAÇÃO DO COELHO NÚMERO 8 TRATADO COM CARBOXITERAPIA



FONTE: O autor (2012)

3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS E OPERATÓRIOS

3.4.1 Considerações gerais

Imediatamente antes da indução anestésica, cada animal teve seu peso aferido e anotado, tendo sido usada a mesma balança para todos os animais.

Os procedimentos anestésicos foram supervisionados por médicos-veterinários do Laboratório de Cirurgia Experimental.

Para a anestesia foram utilizados materiais descartáveis. As operações foram realizadas com material cirúrgico esterilizado em autoclave. A desinfecção dos “Punchs” utilizados foi feita por lavagem, seguida de imersão em Glutaraldeído por, pelo menos, 30 minutos.

Todos as operações foram realizados pela mesma cirurgiã. A equipe cirúrgica contava ainda com um dos médicos veterinários do Laboratório de Cirurgia Experimental e uma técnica de enfermagem.

3.4.2 Anestesia

A anestesia foi realizada por via intramuscular com cloridrato de xilasina, na dose de 5 mg/kg de peso e cloridrato de cetamina, na dose 30 mg/kg associados a bloqueio auricular com 1,5 ml de Xylocaína 1% sem vasoconstritor infiltrada de forma circular na base das orelhas, bilateralmente. Esta anestesia foi utilizada tanto para o ato operatório quanto para as sessões de carboxiterapia ou infiltração de solução salina. Inicialmente era aplicada metade da solução preparada e, conforme a necessidade, repiques anestésicos com $\frac{1}{4}$ da dose foram administrados para manter o animal confortável, durante todo o procedimento.

Os animais foram monitorados por oximetria de pulso medida na cauda, ausculta cardíaca e avaliação clínica realizada pelo médico veterinário. Nos casos em que houve queda da saturação de O₂, foi disponibilizado oxigênio por cateter posicionado próximo às narinas do animal associado à tração da língua.

O procedimento anestésico foi sempre o mesmo, tanto nos dias de carboxiterapia/infiltração de solução salina, quanto nos procedimentos operatórios e antes da eutanásia.

3.4.3 Carboxiterapia/infiltração de solução salina 2 dias antes da operação

Com os animais anestesiados era feita a tricotomia no local a ser abordado (Figura 6).

FIGURA 6 - REALIZAÇÃO DA TRICOTOMIA NA ORELHA DIREITA DO COELHO NÚMERO 4.



FONTE: O autor (2012)

Realizada a identificação, o monitoramento e as fotos pré procedimento, era feito o bloqueio anestésico das orelhas com Xylocaína 1%, seguido pela infiltração de solução salina (grupo SS) ou carboxiterapia pré operatória (grupo CX), com a utilização do aparelho Insuflador de CO₂ Carbtek. O aparelho é acoplado a um cilindro de CO₂ medicinal e controla a velocidade de infiltração do gás (Figura 7).

FIGURA 7 – INSUFLADOR DE CO₂ CARBTEK ACOPLADO AO CILINDRO DE CO₂ MEDICINAL, USADOS NO EXPERIMENTO.



FONTE: O autor (2012)

A carboxiterapia foi realizada com 50ml de CO₂ a 80ml/min., através de punções realizadas tanto na face interna quanto na face externa das orelhas dos animais do grupo CX. Os animais do grupo SS recebiam a infiltração de 1,5ml de solução salina em ambas as faces da orelha. Neste primeiro procedimento, tanto a carboxiterapia quanto a infiltração de solução

salina incluíam a área onde seria realizado o enxerto (Figura 8).

FIGURA 8 - REALIZAÇÃO DA CARBOXITERAPIA NA ORELHA DIREITA DO COELHO 13 DOIS DIAS ANTES DA OPERAÇÃO.



FONTE: O autor (2012)

3.4.4 Descrição do ato operatório

Com os animais anestesiados era feita a antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI) degermante, seguido de PVPI alcoólico. Campos fenestrados estéreis eram posicionados, deixando as orelhas livres.

Seguia-se a realização do bloqueio auricular com a utilização de 1,5ml de Xylocaína 1% através da infiltração do fármaco de forma circular na base das orelhas. A infiltração era precedida de aspiração da seringa de forma a evitar a administração intravascular do anestésico. O procedimento era iniciado pela orelha que constava na identificação do animal.

A retirada do enxerto foi realizada com a ajuda de “punchs” de 1,5cm de diâmetro e de 2cm de diâmetro garantindo, desta forma, que todos os animais tivessem enxertos com os mesmos tamanhos (Figura 9).

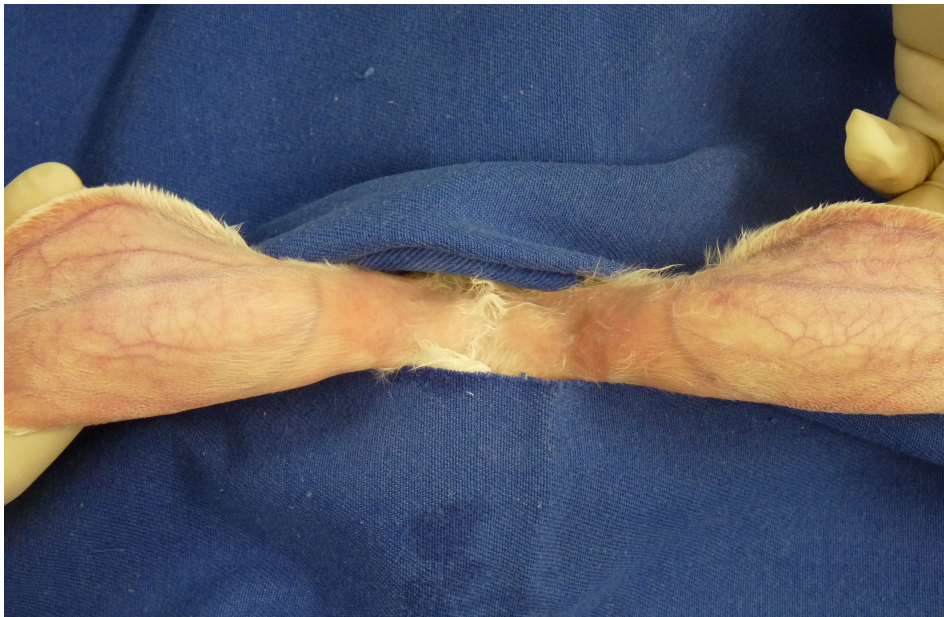
FIGURA 9 – “PUNCH” DE 2 CM DE DIÂMETRO USADO PARA A RETIRADA DOS ENXERTOS DESTE TAMANHO.



FONTE: O autor (2012)

O local para a retirada do enxerto era escolhido levando-se em consideração a vascularização de cada orelha, no ponto mais próximo possível da base que não incluísse nenhum dos grandes vasos visíveis (Figura 10).

FIGURA 10 - DETALHE DA VASCULARIZAÇÃO DAS ORELHAS QUE ERA OBSERVADO NA ESCOLHA DO LOCAL DE RETIRADA DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS.



FONTE: O autor (2012)

O “Punch” era pressionado e girado até a completa desinserção do enxerto. O enxerto era elevado, rodado 90^o em torno do próprio eixo e suturado no seu novo sítio através de chuleio simples com Nylon 5.0.

As suturas eram realizadas primeiramente na face externa, incluindo somente a pele, seguida pela face interna da orelha incluindo pele e cartilagem. A sutura era iniciada pelo posicionamento de 4 pontos cardeais. Era então realizado chuleio entre estes pontos de forma a completar toda a circunferência. Nos pontos cardeais eram mantidos fios longos que seriam posteriormente utilizados na fixação dos curativos (Figura 11).

FIGURA 11 – ENXERTO NA POSIÇÃO FINAL, SUTURA MANTENDO FIOS LONGOS NOS PONTOS CARDEAIS PARA A FIXAÇÃO DOS CURATIVOS.



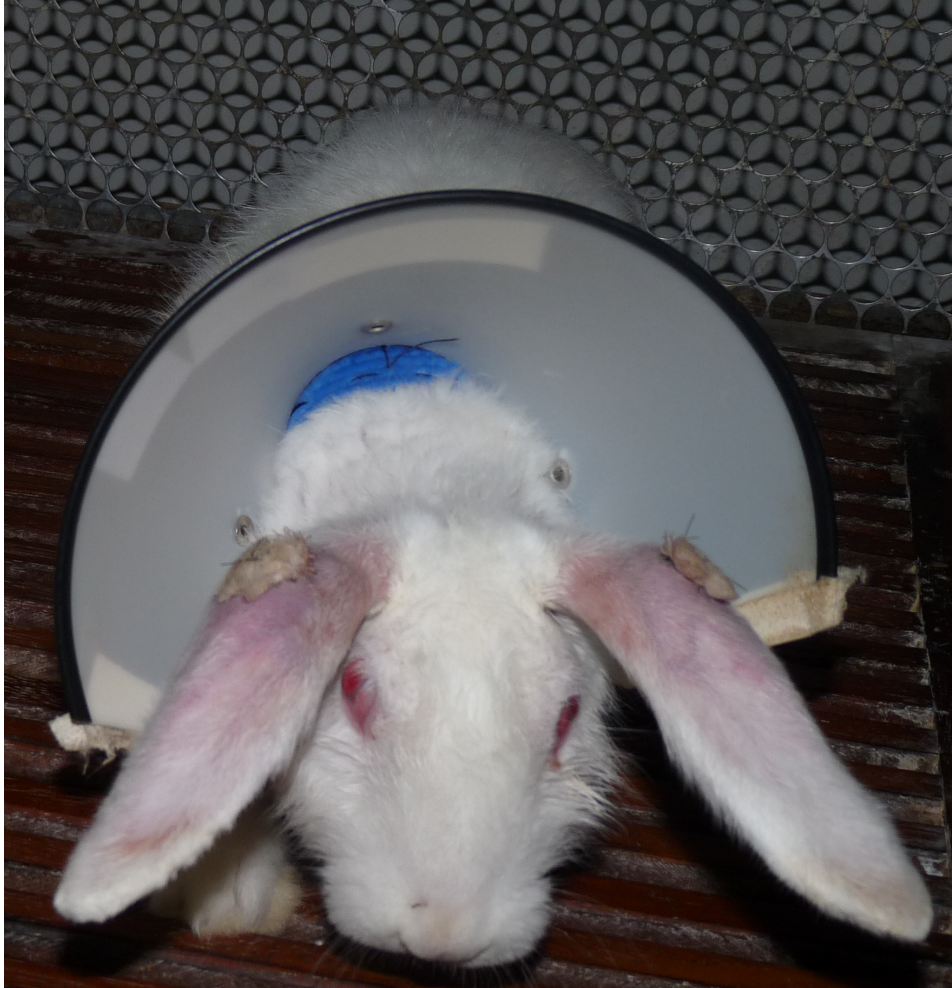
FONTE: O autor (2012)

O procedimento era repetido, então, na outra orelha. Terminada a operação, as orelhas eram fotografadas. Neste momento, era realizada carboxiterapia ou infiltração de solução salina, conforme o grupo. A carboxiterapia era realizada com o mesmo volume de gás e o mesmo fluxo da primeira sessão. As punções eram posicionadas de forma radial distando \pm 1 cm da borda do enxerto e mantendo uma distância aproximada de 2 cm entre cada punção. Não era realizada a administração do gás diretamente no enxerto. A infiltração do solução salina foi feita de maneira análoga. Tanto a infusão do gás quanto a da solução salina podem

ser observadas macroscopicamente pelo abaulamento provocado, o que garantia que todo o tecido que circundava o enxerto fosse descolado.

Finalizando, era confeccionado o curativo atado utilizando gaze besuntada em pomada de Neomicina e Bacitracina (Nebacetin®) que era fixada sobre o enxerto por fios, estrategicamente deixados para este fim, no momento da sutura (Figura 12).

FIGURA 12 – COELHO 8 COM O CURATIVO ATADO E O COLAR ELIZABETANO ADAPTADO



FONTE: O autor (2012)

3.4.5 Evolução pós-operatória

Os coelhos foram mantidos sob observação até plenamente acordados. Quando começavam a acordar, era posicionado um colar “Elizabethano” no. 2. O uso do colar foi essencial para que os animais não manipulassem a ferida nem removessem o curativo. O colar “Elizabethano”, originalmente concebido para cachorros, precisou ser adaptado pois dificultava o acesso dos animais aos recipientes de água e comida. A parte inferior do colar foi seccionada

e um cinturão foi adaptado à parte superior e posicionado no tórax dos animais, impossibilitando a rotação do mesmo – o quê, além de impedir a alimentação, deixaria desprotegidas as orelhas.

Após a operações, os coelhos recebiam a primeira dose de Tramadol, 0.4 mg/kg, aplicada no subcutâneo, repetida em intervalos de 12/12h, durante três dias.

Os coelhos eram, então, transferidos para o alojamento de animais (Figura 13).

FIGURA 13 – COELHO 11 NA GAIOLA, COM O COLAR ADAPTADO.



FONTE: O autor (2012)

3.4.6 Retirada dos curativos e carboxiterapia/infiltração de solução salina no 5^o DPO

No 5^o DPO, os animais eram novamente pesados, anestesiados e os curativos eram removidos. A remoção do curativo era realizada após a aplicação de solução de cloreto de sódio a 0,9% em abundância, para possibilitar a retirada suave da gaze, evitando tração do

enxerto. As orelhas dos animais eram fotografadas e submetidas a novas sessões de carboxiterapia ou infiltração de solução salina, conforme o grupo de cada animal. O procedimento seguia a padronização adotada para o dia da operação, sendo realizada a infiltração de forma radial no tecido circundante ao enxerto, não sendo realizada a infiltração diretamente no enxerto. O enxerto era coberto por uma camada generosa de Nebacetin® em ambas as faces. Os animais eram mantidos em observação até estarem completamente despertos. Os colares eram reposicionados e os animais reconduzidos ao alojamento.

3.4.7 Carboxiterapia/Infiltração de solução salina no 12º DPO

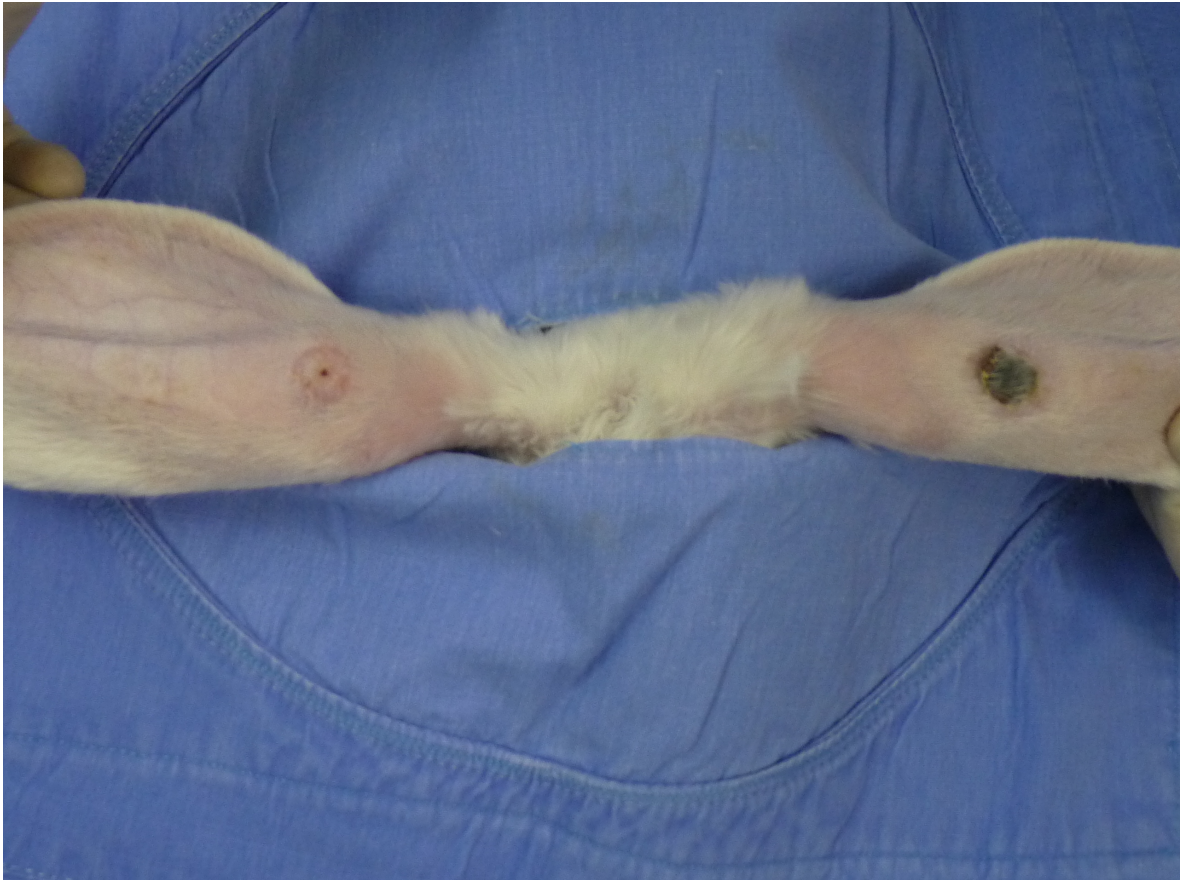
No 12º DPO os animais eram pesados, anestesiados, fotografados e submetidos à última sessão de carboxiterapia ou infiltração de solução salina. Concluída a recuperação pós anestésica, os animais eram reconduzidos ao alojamento, sem o colar “Elizabetano”.

3.4.8 Eutanásia

Os animais foram novamente pesados, fotografados e submetidos à eutanásia no 21º DPO. A eutanásia foi realizada com superdose de tiobarbiturato etil sódico (Thionembital®, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) aplicado na cavidade peritoneal, com os animais anestesiados.

As fotografias eram feitas primeiramente com os animais ainda vivos, mas anestesiados. Era feita a limpeza e a remoção das crostas das orelhas (Figura 14).

FIGURA 14 - FOTOGRAFIA DAS ORELHAS DO COELHO 8 NO 21º. DIA PÓS OPERATÓRIO AINDA COM A CROSTA SOBRE A FERIDA

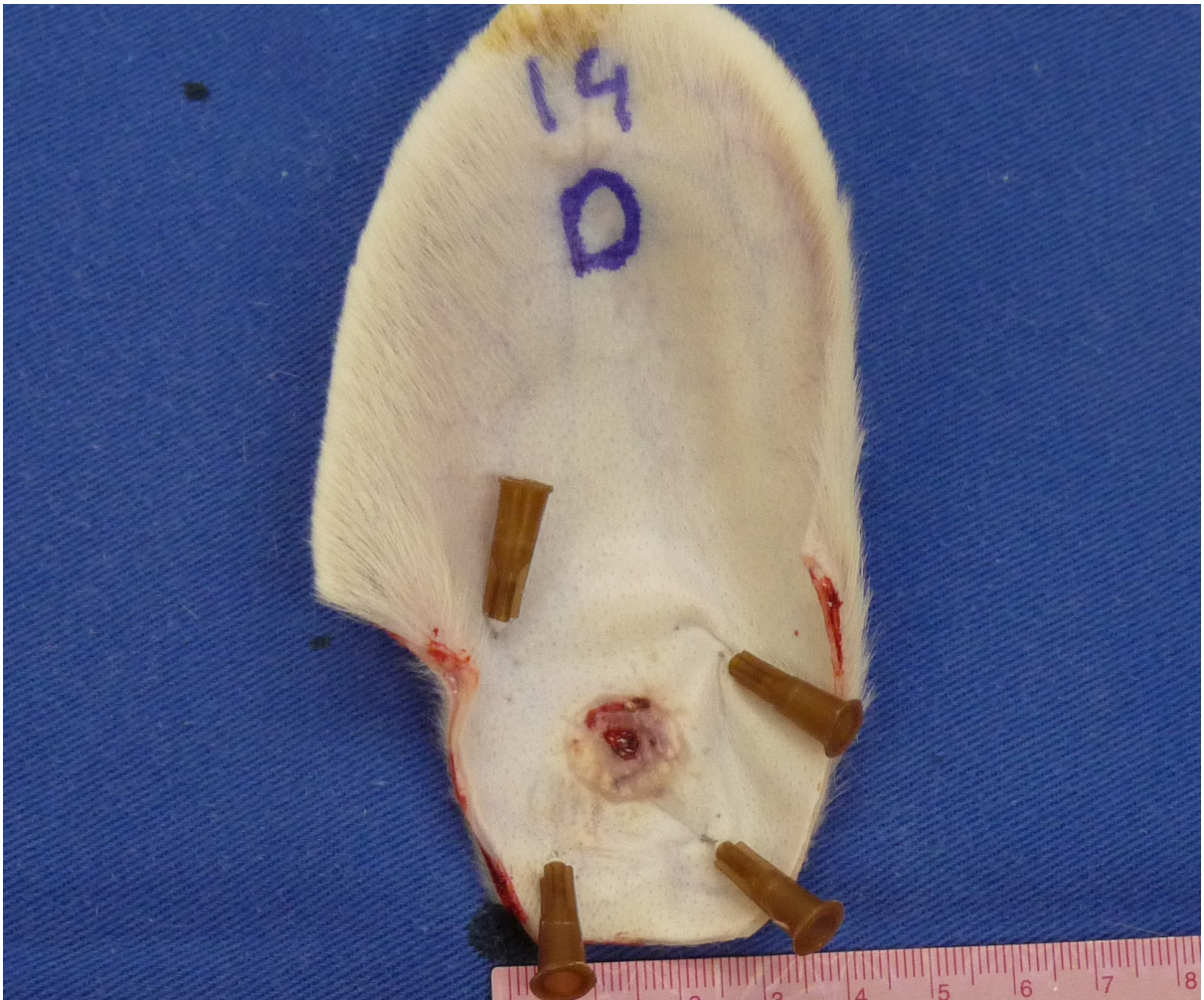


FONTE: O autor (2012)

As fotos foram feitas com a mesma distância e aquelas destinadas a verificação da pega dos enxertos contavam com a presença de uma régua que permitia a padronização do cálculo das áreas. Para manter a mesma distância, foi usada sempre a mesma mesa operatória e a máquina fotográfica foi posicionada em um tripé.

Constatado o óbito do animal, as orelhas eram retiradas e fixadas em uma placa de papelão recoberto por campo cirúrgico. As peças eram fotografadas em ambas as faces (Figura 15). Seguia-se o preparo de uma peça contendo a área do enxerto associada a 0,5cm do tecido circundante. Este material foi guardado embebido em formol.

FIGURA 15 – ORELHA DIREITA DO COELHO 14 FIXADA NA PLACA DE PAPELÃO, JÁ REALIZADA A RETIRADA DAS CROSTAS.



FONTE: O autor (2012)

3.4.9 Estudo histopatológico

As peças cirúrgicas guardadas no formol tamponado a 10% foram enviadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para preparo dos blocos de parafina. Foram realizados cortes que dividiam a área do enxerto em duas metades e foi corado pela hematoxilina e eosina, conforme a rotina do laboratório. A avaliação das lâminas foi realizada por microscopia de luz, por patologista experiente que desconhecia o grupo a que pertencia cada animal. As análises foram feitas nas áreas dos enxertos.

Os seguintes fatores foram analisados em cada lâmina:

1. Neovascularização
2. Colágeno
3. Fibroblastos

4. Mononucleares
5. Hiperplasia epitelial
6. Folículos pilosos viáveis
7. Necrose parcial e ulceração da pele
8. Necrose total da pele sem perfuração da cartilagem
9. Necrose total da pele com perfuração da cartilagem
10. Necrose da cartilagem

Os itens 1 a 4 foram classificados em leve, moderado ou intenso (1+ a 3+) e os itens 5 a 10 em presente (1) ou ausente (2).

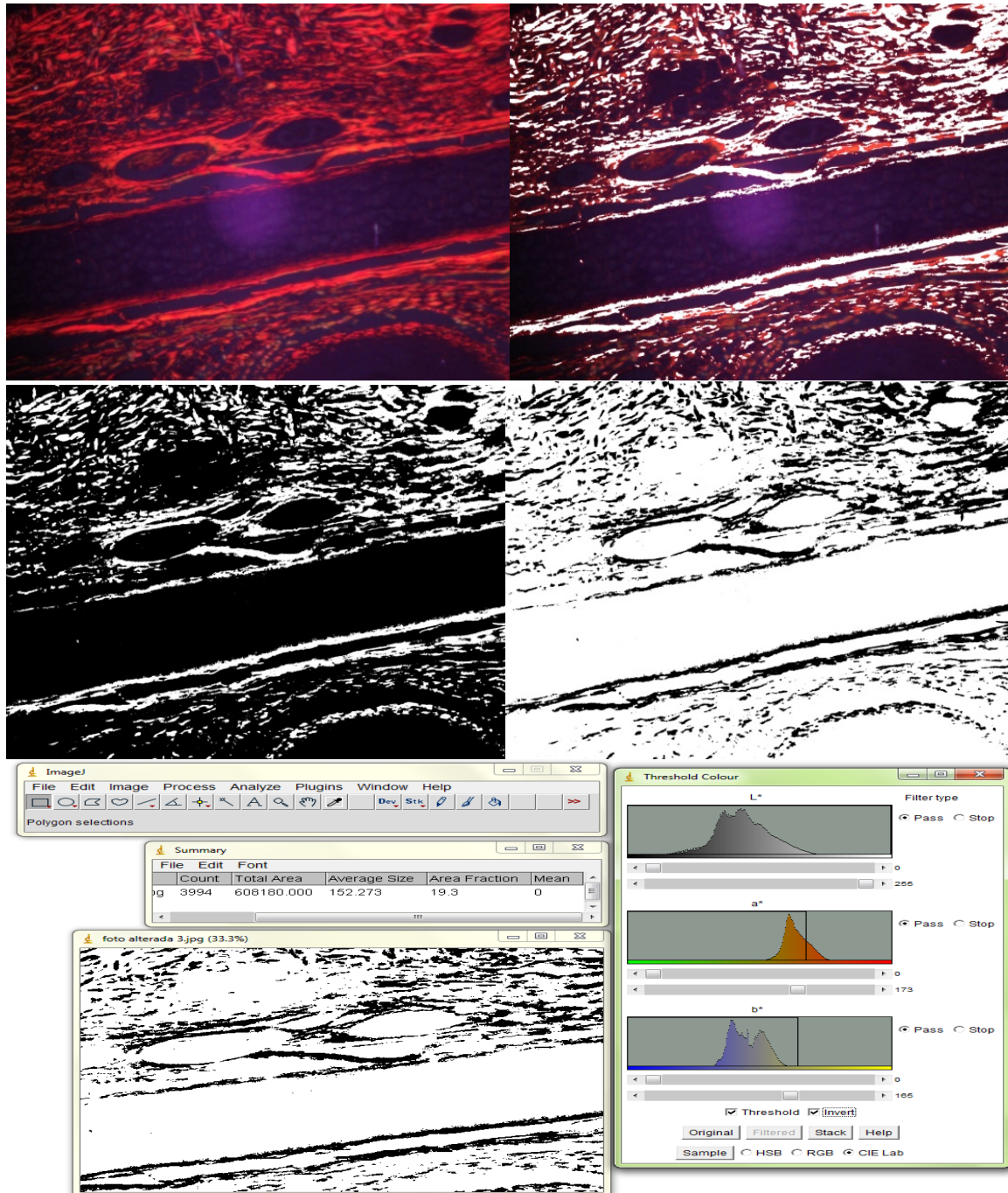
3.4.10 Estudos histomorfométricos do colágeno

Lâminas foram preparadas com peças coradas pelo Picro-Sirius. A análise qualitativa do colágeno, quanto ao aparecimento de formas jovens (colágeno tipo III) e madura (colágeno tipo I), foi realizada pela leitura das lâminas coradas pelo Picro-Sirius por microscopia de luz polarizada. Esta leitura foi feita por patologista experiente que desconhecia o grupo de origem das lâminas. As lâminas foram classificadas quanto ao tipo de colágeno predominante em colágeno tipo 1(1), colágeno tipo 3 (3) e misto (2). Foram analisadas as lâminas de todos os animais que chegaram ao final do experimento. A análise abrangeu a área total das lâminas.

Para a análise quantitativa por histomorfometria do colágeno presente nas peças, foram selecionadas somente as lâminas que permitiam a diferenciação das áreas de borda, transição e enxerto. Foram feitas, em média, 5 fotografias abrangendo toda a área da borda, 3 fotografias da transição e 18 do enxerto, para cada lâmina.

A captura das imagens foi obtida através de câmera digital Sony Cyber-shot com resolução de 3 mega pixels, zoom de 4X e luminosidade de -2EV. A câmera foi acoplada a um Microscópio de luz Zeiss Axion Star (Carl Zeiss Vision – Alemanha) utilizando o aumento de 5X e lente polarizadora. As imagens foram analisadas por meio do software Image J NIH® (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) que possibilita o cálculo do percentual de colágeno existente em cada fotografia (Figura 16).

FIGURA 16 –EXEMPLO DO PROCESSO DE CÁLCULO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO PRESENTE NAS LÂMINAS. NO SENTIDO HORÁRIO TEMOS: FOTOGRAFIA DA LÂMINA; MARCAÇÃO DA ÁREA A SER ANALISADA; EXCLUSÃO DO RESTANTE DA IMAGEM; INVERSÃO DA ÁREA. ABAIXO, RESULTADO OBTIDO PELO IMAGE J NIH ®.



FONTE: O autor (2012)

3.4.11 Avaliação da pega do enxerto

A avaliação da pega do enxerto foi feita através do cálculo das áreas usando as fotografias feitas no 21º DPO (Figura 17).

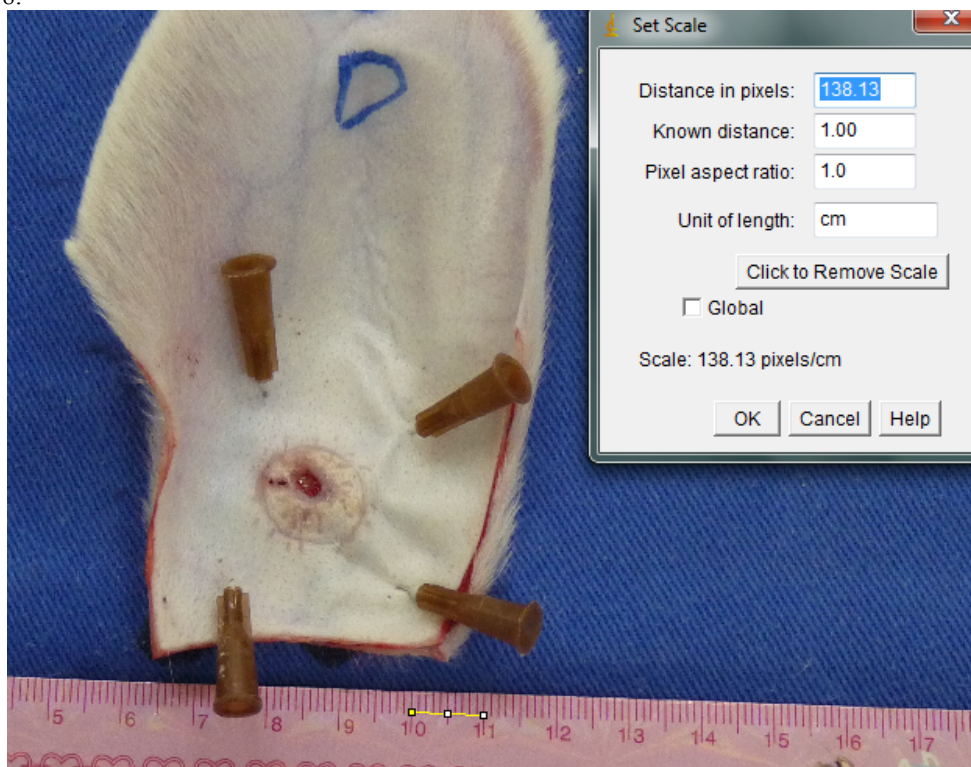
FIGURA 17 – FOTOGRAFIA DA PEÇA CIRÚRGICA DA ORELHA DIREITA DO COELHO 16 USADA PARA O CÁLCULO DA ÁREA DE PEGA DO ENXERTO



FONTE: O autor (2012)

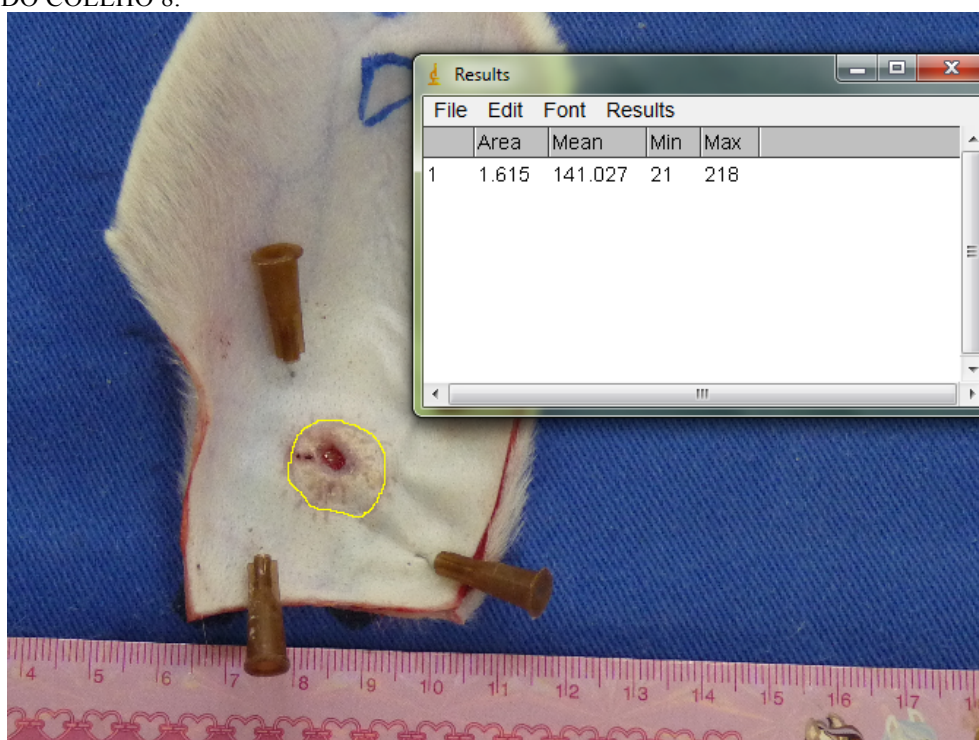
Com o auxílio do software Imagem J NIH®, foram calculadas a área total do enxerto, a área de pega parcial e de perda total (Figuras 18, 19 e 20).

FIGURA 18 – EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDRUCUTÂNEO: PADRONIZAÇÃO DA ESCALA DA FOTOGRAFIA DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.



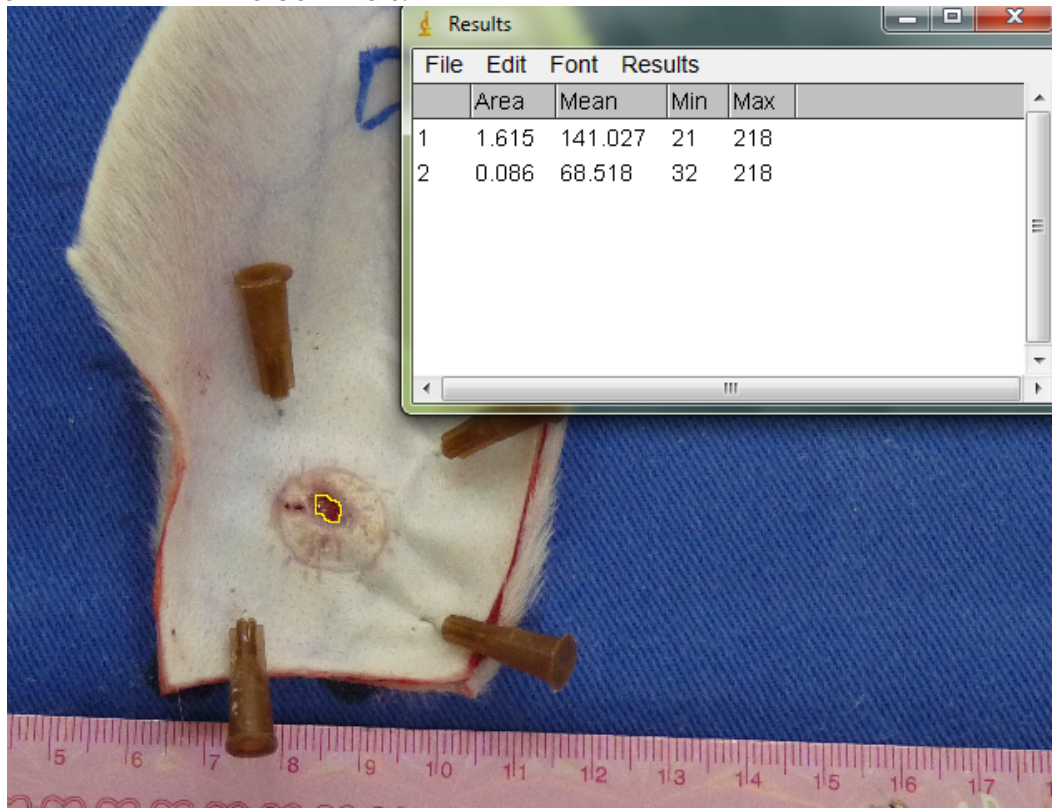
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 19 – EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDRUCUTÂNEO: DELIMITAÇÃO E MEDIDA DA ÁREA TOTAL DO ENXERTO DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.



FONTE: O autor (2012)

FIGURA 20 – EXEMPLO DO PROCESSO PARA CÁLCULO DAS ÁREAS DO ENXERTO CONDRUCUTÂNEO: DELIMITAÇÃO E MEDIDA DA ÁREA DE PEGA PARCIAL DO ENXERTO DA ORELHA DIREITA DO COELHO 8.



FONTE: O autor (2012)

3.4.12 Análise Estatística

Os resultados foram analisados, sob o ponto de vista estatístico, utilizando o software SPSS 20.0 (Special Package for Social Sciences) e Microsoft Excel.

A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar o peso inicial dos animais e os percentuais de pega dos enxertos, nos dois grupos. O teste t-Student para comparar o ganho de peso dos animais nos grupos CX e SS.

O teste Kruskal-Wallis para comparar: a intensidade de neovascularização, colágeno, fibroblastos e mononucleares ao estudo histopatológico. Foi usado também para avaliar a quantidade de colágeno no estudo histomorfométrico. O teste exato de Fisher, o tipo de colágeno e a presença ou não de: hiperplasia epitelial, folículos pilosos viáveis, ulceração e necrose de pele e cartilagem.

Na comparação pareada da quantidade de colágeno nas diferentes localizações (borda, transição e enxerto), nos dois grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney.

Todas as probabilidades menores que 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significantes.

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Dois animais morreram, durante o experimento. Os dois animais pertenciam ao grupo CX e morreram durante a anestesia para a realização da carboxiterapia. O primeiro óbito ocorreu no coelho de número 10, no 5º DPO, e o segundo foi o número 15, no 12º DPO.

Não foram observadas intercorrências com os outros animais. Todos os animais permaneceram, durante todo o experimento, sem sinais de infecção.

4.2 PESO DOS ANIMAIS

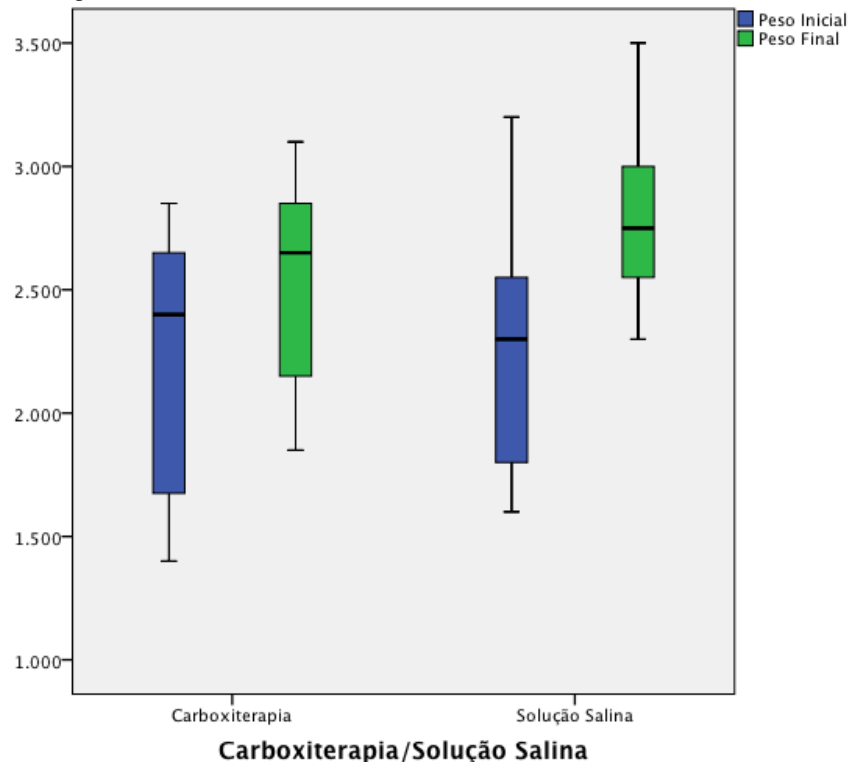
O peso inicial dos animais do grupo CX variou de 1400g a 2850g (média de 2180g). O peso inicial dos animais de grupo SS variou de 1600g a 3200g (média de 2265g). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CX e SS quando analisado o peso inicial ($p=0,713$)(Tabela 1)(Gráfico 1).

TABELA 1 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DO PESO DOS ANIMAIS, NOS DOIS GRUPOS, NO INÍCIO DO EXPERIMENTO E NO DIA DA EUTANÁSIA.

	Peso Inicial		Peso Final	
	Grupo CX	Grupo SS	Grupo CX	Grupo SS
N	10	10	8	10
Média	2180,00g	2265,00g	2531,25g	2795,00g
Mediana	2325,00g	2300,00g	2650,00g	2750,00g
Desvio Padrão	513,81g	505,00g	460,54g	380,34g
Valor Mínimo	1400g	1600g	1850g	2300g
Valor Máximo	2850g	3200g	3100g	3500g

FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 1- PESO DOS COELHOS SUBMETIDOS A CARBOXITERAPIA OU SOLUÇÃO SALINA, NO INÍCIO DO EXPERIMENTO E NO DIA DA EUTANÁSIA. NA COMPARAÇÃO DO GANHO DE PESO ENTRE OS GRUPOS, $p=0,038$. VALORES EM GRAMAS.



FONTE: O autor (2012).

Todos os animais ganharam peso durante o período do experimento. Quando comparado o peso adquirido entre os animais do grupo CX (média de ganho $318,75g \pm 143,77g$) e os animais do grupo SS (média de ganho $530g \pm 245,18g$), os animais do grupo CX ganharam menos peso que os animais do grupo SS e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,038$)(gráfico 1).

4.3 ANÁLISE DA PEGA DO ENXERTO

4.3.1 Percentual de pega total do enxerto

Nos enxertos de 1,5 cm de diâmetro do grupo CX, o percentual de pega total do enxerto calculado a partir da face interna da orelha foi variou de 69,48% a 100% (média de 86,84%); enquanto no grupo SS o percentual de pega total avaliado na face interna variou de 72,79% a 100% (média de 87,76%)(tabela 2)(gráfico 2). A comparação entre os grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de pega total na face interna ($p=0,843$).

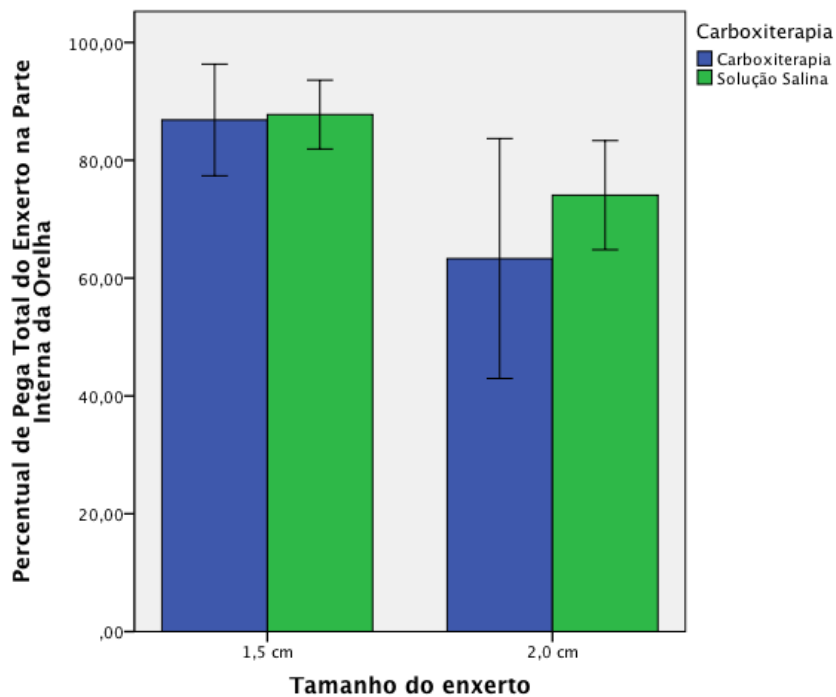
Nos enxertos de 2 cm de diâmetro do grupo CX, o percentual de pega total avaliado na face interna variou de 5,03% a 80,92% (média de 63,31%). No grupo SS, o percentual de pega total dos enxertos avaliado na face interna variou de 57,58% a 100% (média de 74,08%)(tabela 2)(gráfico 2). Não houve diferença entre os grupos na comparação dos percentuais de pega total dos enxertos na face interna das orelhas ($p=0,245$).

TABELA 2 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS CONDDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

	Grupo A - Carboxiterapia		Grupo B – Soro	
	1,5 cm	2 cm	1,5 cm	2 cm
	Média	86,84%	63,31%	87,76%
Mediana	90,80%	68,23%	87,92%	72,41%
Desv. padrão	11,34%	24,36%	8,17%	12,94%
Mínimo	69,48%	5,03%	72,79%	57,58%
Máximo	100%	80,92%	100%	100%

FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 2 – PERCENTUAL DE PEGA TOTAL DO ENXERTO CONDDROCUTÂNEO NA FACE INTERNA DA ORELHA DO COELHO DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA E CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO.



$p=0,843$

$p=0,245$

FONTE: O autor (2012)

No grupo CX, os enxertos de 1,5 cm apresentaram um percentual de pega total na parte externa de 77,16% a 100% (média de 90,20%) , enquanto no grupo SS variou de 77,17% a 100% (média de 92,70%)(tabela 3)(gráfico 3). Comparando o percentual de pega total na face externa entre os grupos, não houve diferença significativa ($p=0,567$).

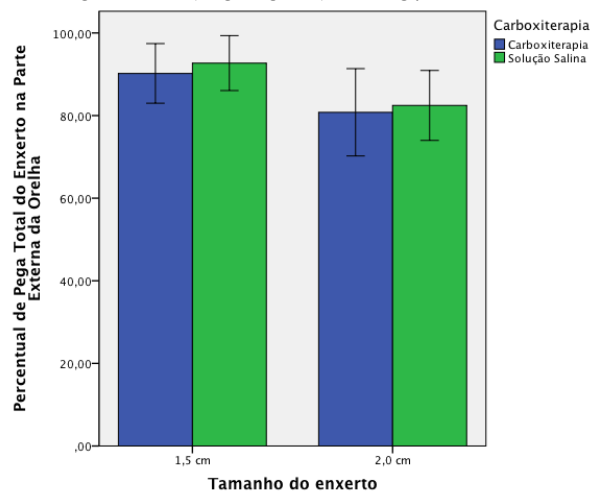
Nos enxertos de 2 cm, o grupo CX apresentou um percentual de pega total na face externa de 61,46% a 98,14% (média de 80,79%), enquanto o grupo SS variou de 68,76% a 100% (média de 82,45%)(tabela 3)(gráfico 3). Na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa no percentual de pega total dos enxertos de 2 cm avaliado na face externa das orelhas ($p=0,777$).

TABELA 3 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

Percentual de pega total da parte externa				
	Grupo A - Carboxiterapia		Grupo B – Soro	
	1,5 cm	2 cm	1,5 cm	2 cm
Média	90,20%	80,79%	92,70%	82,45%
Mediana	92,83%	78,77%	96,80%	78,98%
Desv. padrão	8,62%	12,64%	9,28%	11,84%
Mínimo	77,16%	61,46%	77,17%	68,76%
Máximo	100%	98,14%	100%	100%

FONTE : O autor (2012)

GRÁFICO 3 – PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA E O TAMANHO DO ENXERTO.



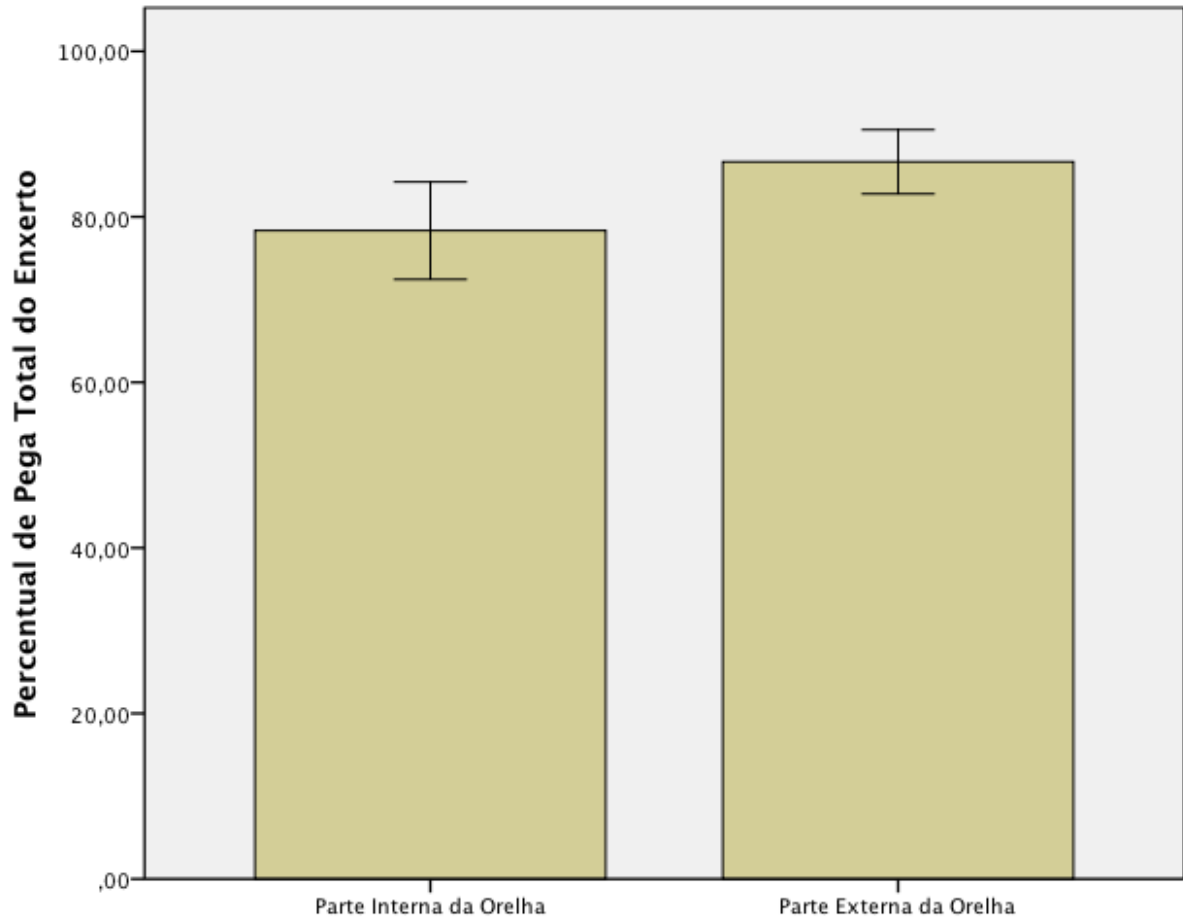
$p=0,567$

$p=0,777$

FONTE: O autor (2012)

O percentual de pega total do enxerto quando avaliado na face externa é maior se comparado ao percentual avaliado na face interna das orelhas ($p < 0,001$)(Gráfico 4).

GRÁFICO 4 – PERCENTUAL DE PEGA TOTAL DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO AVALIADO NA FACE INTERNA COMPARADO COM O PERCENTUAL AVALIADO NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS.

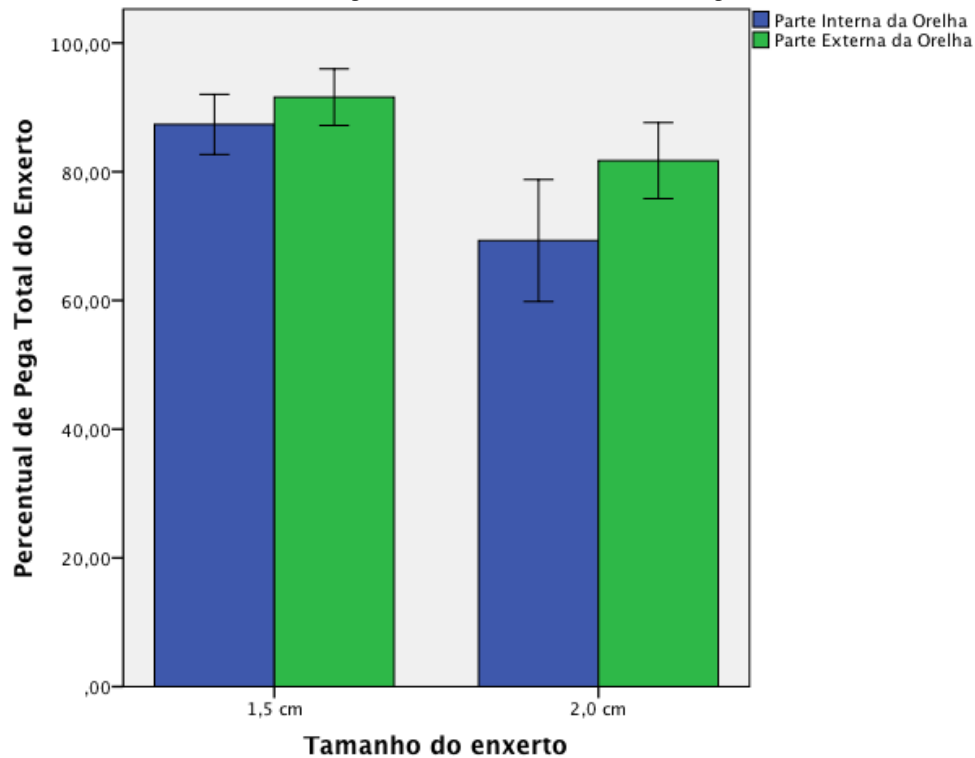


$p < 0,001$

FONTE: O autor (2012)

O tamanho do enxerto influencia no percentual de pega. Os enxertos de 1,5 cm apresentam percentual de pega maior que os enxertos de 2 cm tanto na face externa ($p=0,008$), quanto na face interna ($p=0,001$)(Gráfico 5).

GRÁFICO 5 – INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO NOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL DOS ENXERTOS, AVALIADOS NA FACE INTERNA E EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS. NA FACE INTERNA, $p=0,001$; NA FACE EXTERNA, $p=0,008$.



FONTE: O autor (2012)

4.3.2 Percentual de pega total somado ao percentual de pega parcial

Foi analisado também o percentual de pega total mais pega parcial dos enxertos. Na comparação entre os grupos CX e SS nos enxertos de 1,5 cm, não houve diferença significativa na pega total mais parcial calculada a partir da face interna ($p=0,559$)(Tabela 4) (Gráfico 6), como também não mostrou diferença a pega total mais parcial na face externa ($p=0,873$)(Tabela 5)(Gráfico 7).

Nos enxertos de 2 cm, não houve diferença entre os grupos, quando comparadas as áreas de pega total mais parcial dos enxertos calculadas a partir da face interna das orelhas ($p=0,819$)(Tabela 4), nem da face externa ($p=0,688$)(Tabela 5) (Gráficos 6 e 7).

TABELA 4 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

Percentual de pega total mais pega parcial na face interna				
	Grupo A - Carboxiterapia		Grupo B – Solução salina	
	1,5 cm	2 cm	1,5 cm	2 cm
Média	97,59%	88,82%	99,02%	90,41%
Mediana	100%	94,34%	100%	97,12%
Desv. padrão	6,8%	17,07%	3,08%	11,81%
Mínimo	80,76%	49,91%	90,26%	71,27%
Máximo	100%	100%	100%	100%

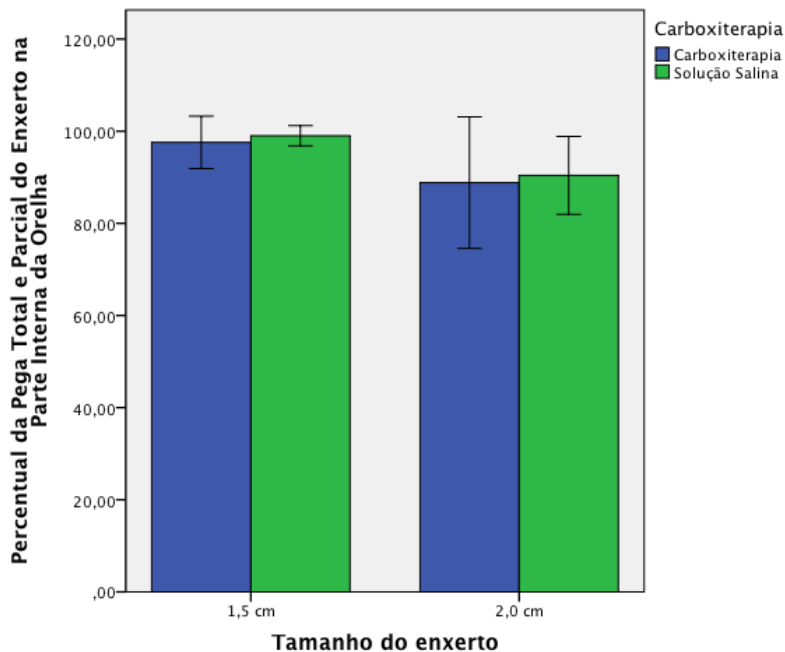
FONTE: O autor (2012)

TABELA 5 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALOR MÍNIMO E MÁXIMO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

Percentual de pega total mais parcial na face externa				
	Grupo A - Carboxiterapia		Grupo B – Solução salina	
	1,5 cm	2 cm	1,5 cm	2 cm
Média	97,32%	89,75%	97,87%	92,01%
Mediana	100%	91,27%	100%	100%
Desv. padrão	7,56%	11,23%	6,72%	11,99%
Mínimo	78,61%	74,36%	78,73%	71,24%
Máximo	100%	100%	100%	100%

FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 6 – PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

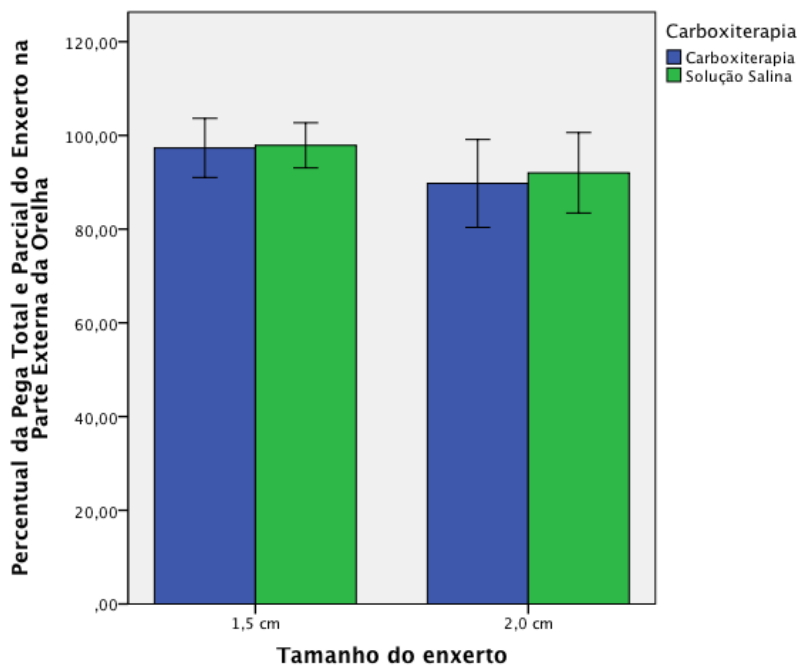


$p=0,559$

$p=0,819$

FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 7 – PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADOS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS CONFORME O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.



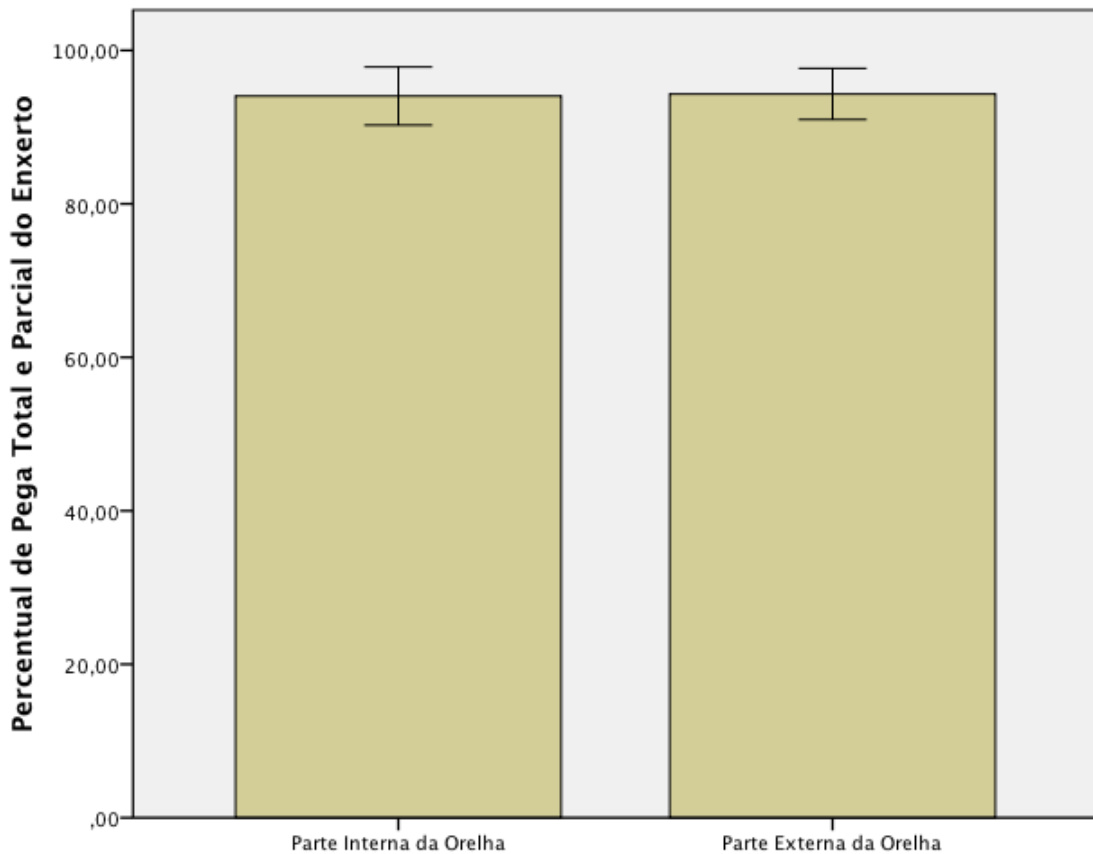
$p=0,873$

$p=0,688$

FONTE: O autor (2012)

Não houve diferença quando o percentual de pega total mais parcial dos enxertos era avaliado na face interna ou externa das orelhas, $p=0,777$ (Gráfico 8).

GRÁFICO 8 – COMPARAÇÃO DOS PERCENTUAIS DE PEGA TOTAL E PARCIAL DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS QUANDO AVALIADOS NA FACE INTERNA OU EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS.



$p=0,777$

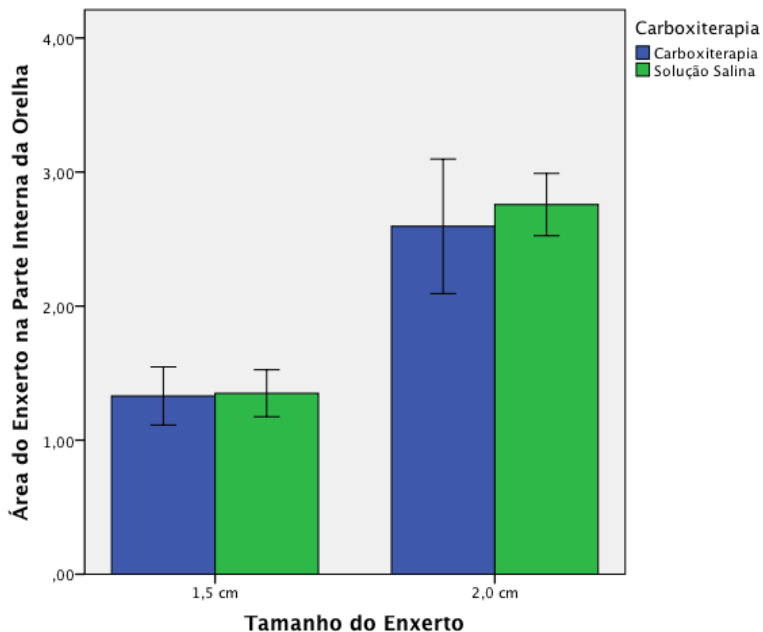
FONTE: O autor (2012)

4.3.3 Área total do enxerto

Foi comparada ainda a área total do enxerto para verificar se o uso da carboxiterapia poderia ter influenciado na área final do enxerto devido à retração. Não houve diferença significativa entre os grupos. Entre os enxertos de 1,5 cm, quando avaliadas as áreas totais dos enxertos avaliadas na face interna das orelhas, a comparação entre os grupos apresentou um $p=0,866$ (gráfico 9). Na área total avaliada na parte externa, $p=0,298$ (gráfico 10).

Nos enxertos de 2 cm, a comparação da área total da parte interna mostrou um $p=0,484$ (gráfico 9). A comparação da área total na parte externa das orelhas dos grupos CX e SS teve um $p=0,626$ (gráfico 10).

GRÁFICO 9 – ÁREAS TOTAIS DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADAS NA FACE INTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

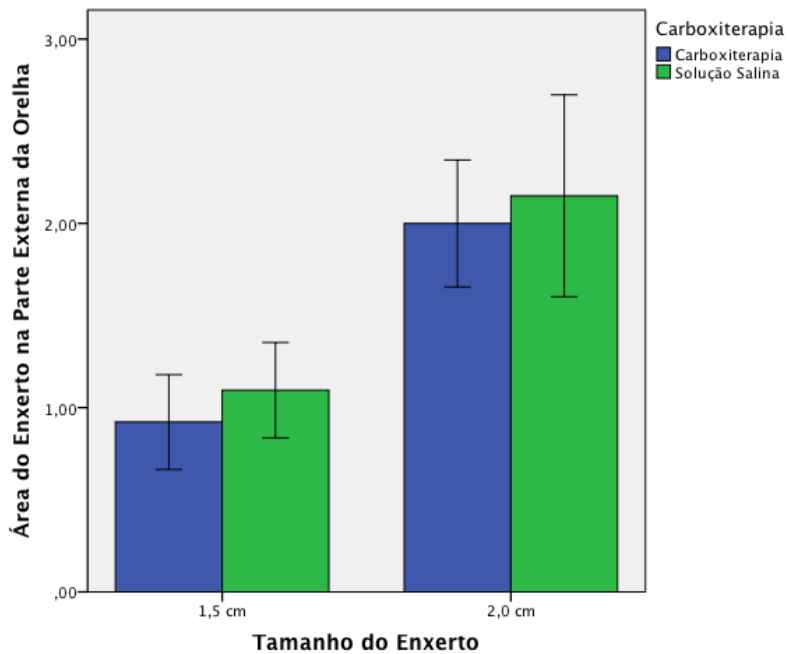


$p=0,866$

$p=0,484$

FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 10 – ÁREAS TOTAIS DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS AVALIADAS NA FACE EXTERNA DAS ORELHAS DOS COELHOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO E O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.



$p=0,298$

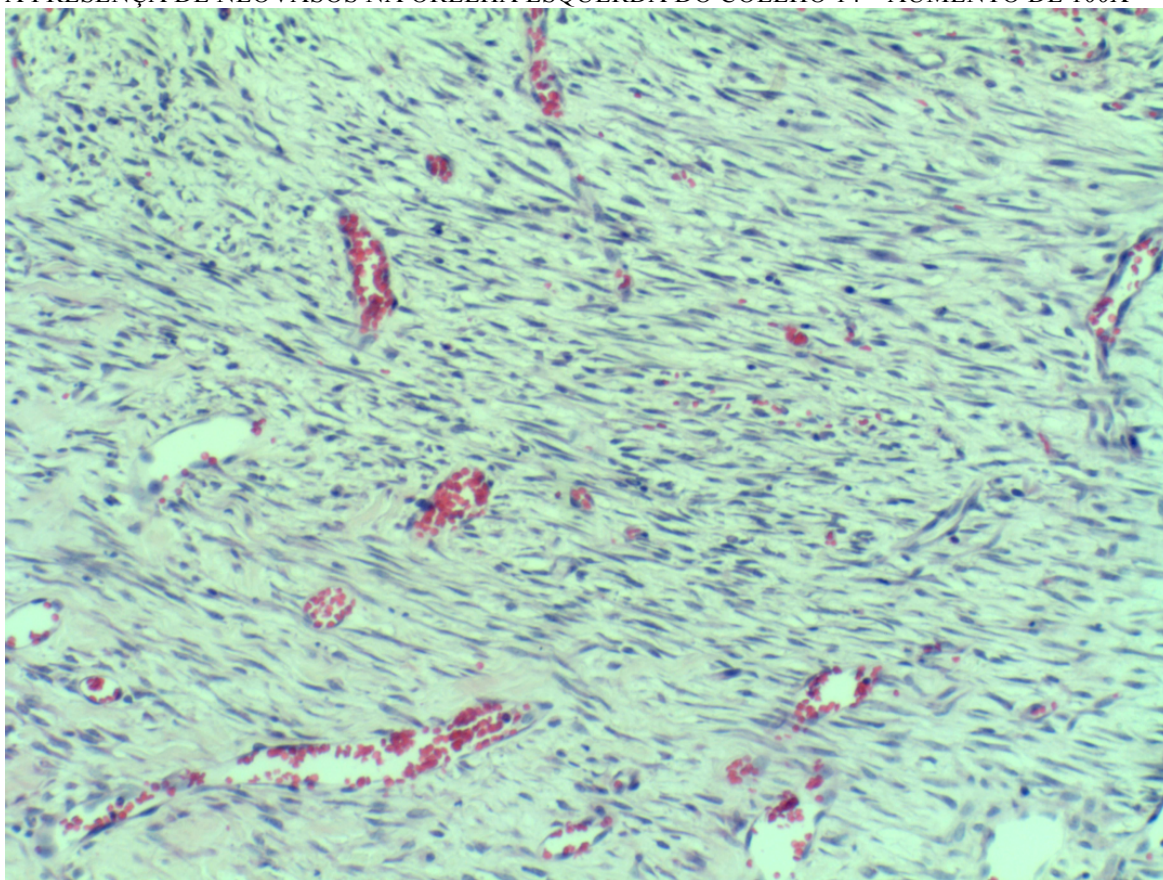
$p=0,626$

FONTE: O autor (2012)

4.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

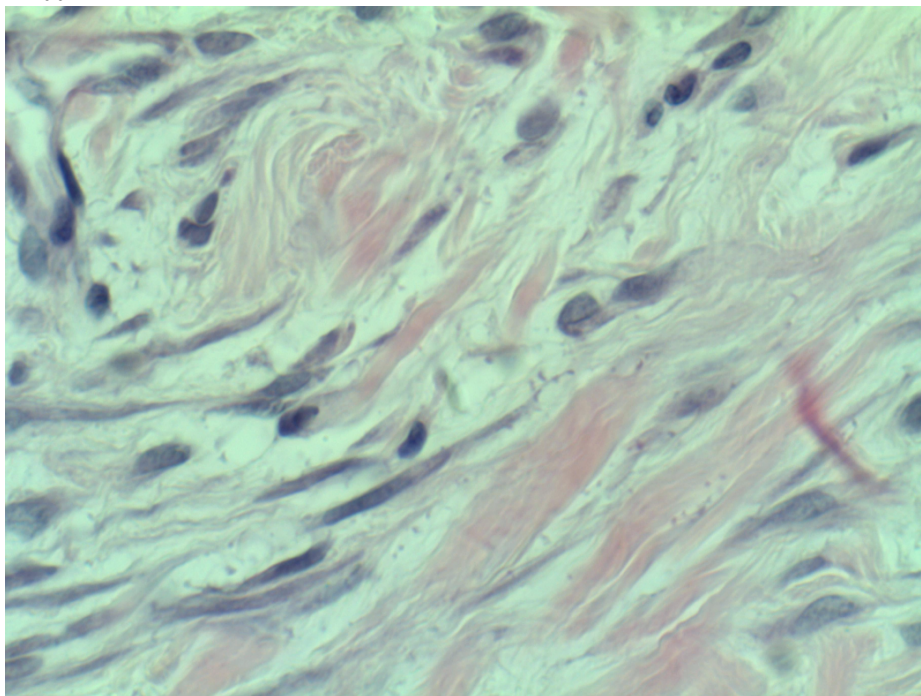
As lâminas contendo amostras da área do enxerto, coradas pela hematoxilina e eosina, foram analisadas quanto à presença de neovascularização (Figura 21), colágeno (Figura 22), fibroblastos (Figura 22), mononucleares, hiperplasia epitelial (Figura 23) , folículos pilosos viáveis, necrose parcial e ulceração da pele (Figura 24), necrose total da pele sem perfuração (Figura 25), necrose total da pele com perfuração e necrose da cartilagem.

FIGURA 21 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO A PRESENÇA DE NEOVASOS NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 100X



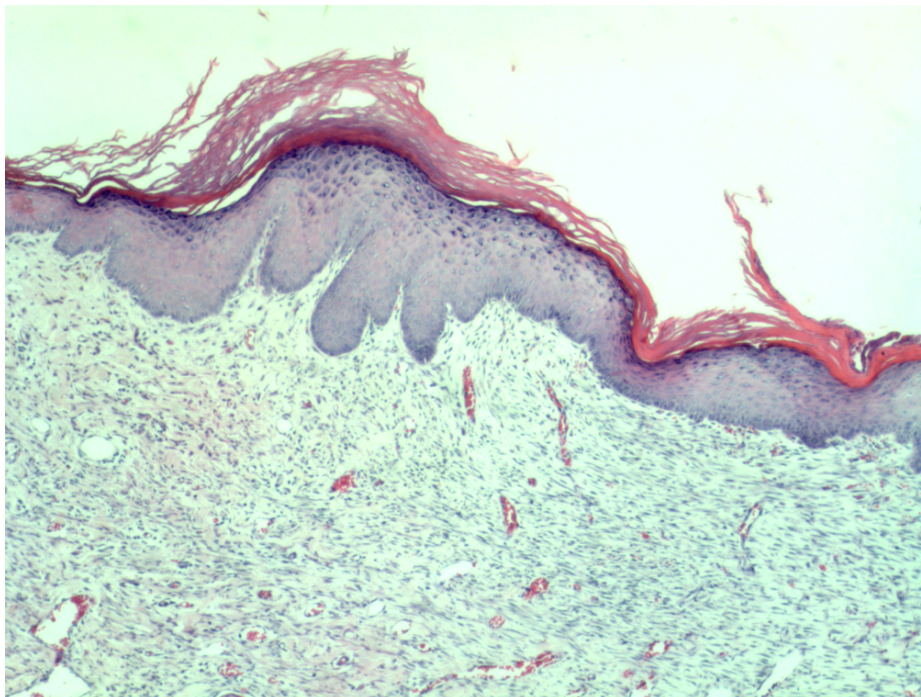
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 22 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO A PRESENÇA DE COLÁGENO E FIBROBLASTOS NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 400X



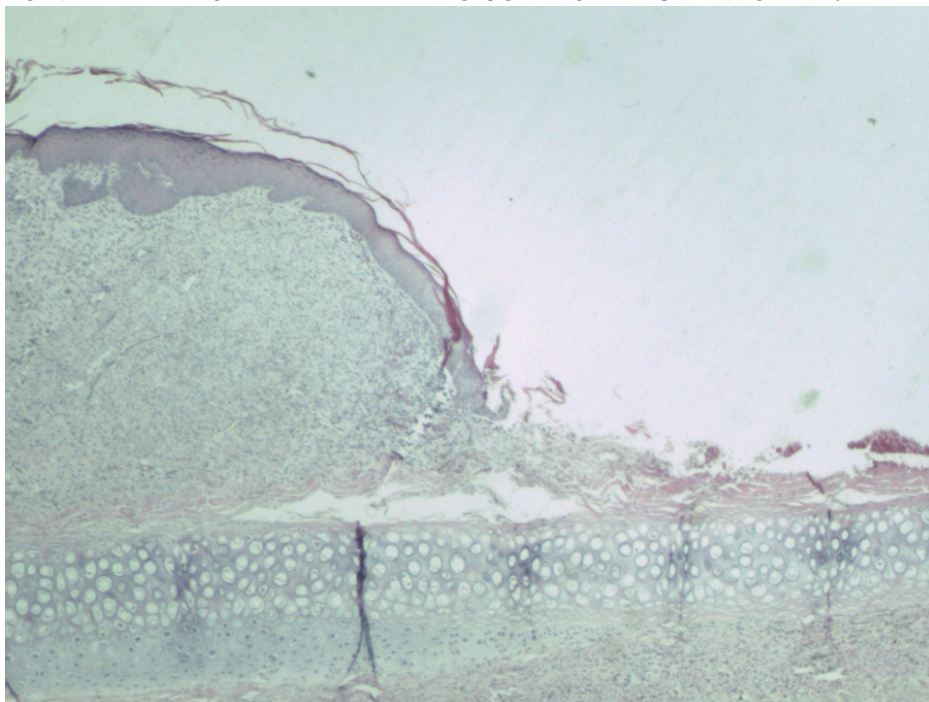
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 23 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO HIPERPLASIA EPIDÉRMICA E FIBROSE DÉRMICA NA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 14 – AUMENTO DE 40X



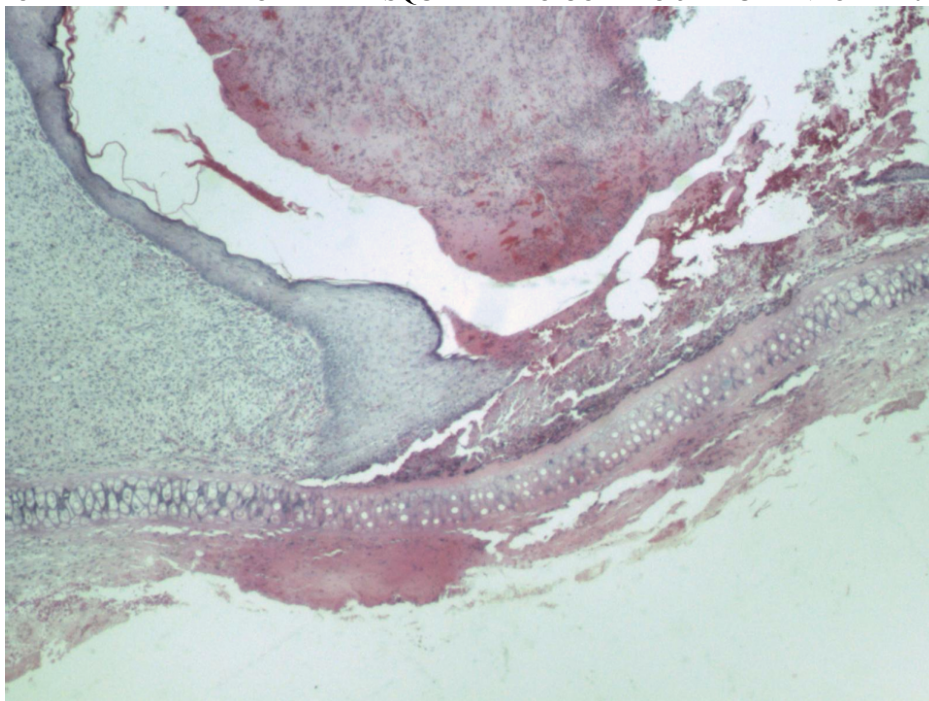
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 24 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO ULCERAÇÃO NA PELE DA ORELHA DIREITA DO COELHO 4 – AUMENTO DE 20X



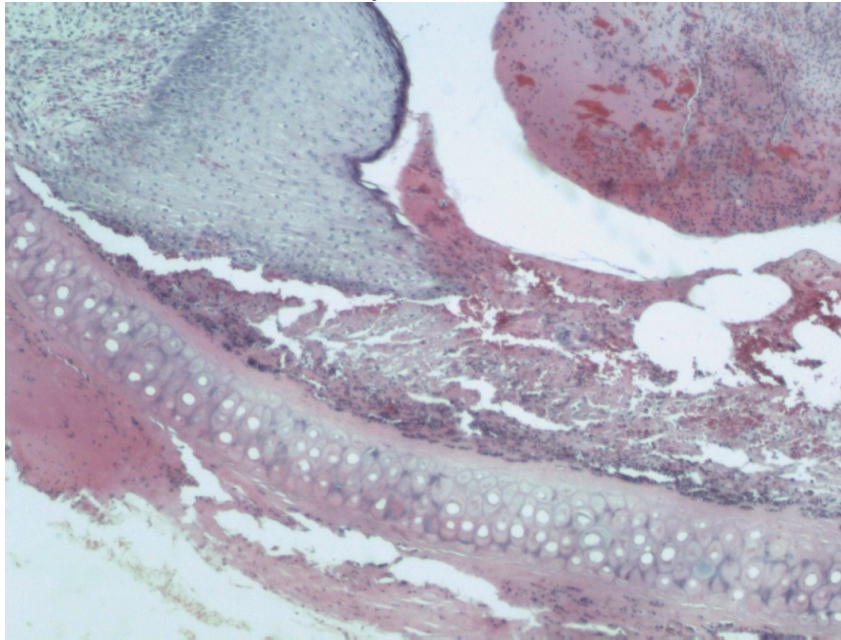
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 25 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO NECROSE TOTAL DA PELE DA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 5 – AUMENTO DE 20X



FONTE: O autor (2012)

FIGURA 26 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELA HEMATOXILINA E EOSINA MOSTRANDO NECROSE TOTAL DA PELE DA ORELHA ESQUERDA DO COELHO 5 – AUMENTO DE 40X



FONTE: O autor (2012)

Foram analisados separadamente os enxertos de 1,5 cm de diâmetro e os enxertos de 2 cm de diâmetro e comparados os grupos CX e SS. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, como pode ser verificado na tabela mostrando o “*p*” encontrado para cada uma das variáveis (Tabela 6).

TABELA 6 – VALOR DE “*p*” ENCONTRADO NA COMPARAÇÃO DOS DADOS HISTOLÓGICOS ENTRE OS GRUPOS CX E SS.

Comparação dos Achados Histopatológicos entre os Grupos		
	1,5 cm	2 cm
Neovascularização	<i>p</i> =0,388	<i>p</i> =0,819
Colágeno	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Fibroblasto	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Mononucleares	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Hiperplasia Epitelial	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Folículos Pilosos Viáveis	<i>p</i> =0,637	<i>p</i> =0,664
Necrose parcial e ulceração da pele	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Necrose total da pele sem perfuração	<i>p</i> =1	<i>p</i> =0,588
Necrose total da pele com perfuração	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1
Necrose da cartilagem	<i>p</i> =1	<i>p</i> =1

FONTE: O autor (2012)

4.5 ESTUDOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO COLÁGENO

4.5.1 Estudo qualitativo do colágeno

As lâminas coradas pelo Picro-sirius foram analisadas quanto ao tipo de colágeno predominante: colágeno tipo I, tipo III ou misto (tabela 7).

TABELA 7 – TIPO DE COLÁGENO PREDOMINANTE NAS LÂMINAS CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

Grupo	Colágeno Tipo I	Colágeno misto	Colágeno Tipo III	Total
CX	3	11	2	16
SS	3	12	5	20
Total	6	23	7	36

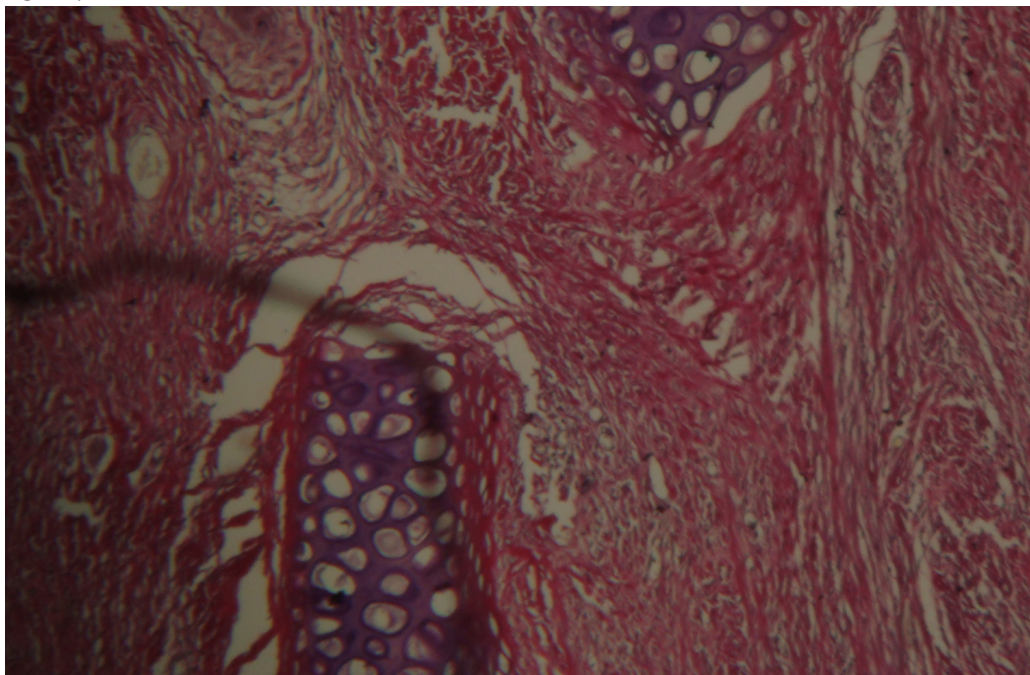
FONTE: O autor (2012)

O tipo de colágeno predominante nas lâminas não foi diferente quando comparados os dois grupos ($p=0,633$). Ao analisarmos separadamente os diferentes tamanhos de enxerto em relação ao tipo de colágeno quando submetidos ou não à carboxiterapia, também não foi verificada diferença: entre os enxertos de 1,5 cm, $p=1$; entre os enxertos de 2 cm, $p=0,638$.

4.5.2 Estudo quantitativo do colágeno

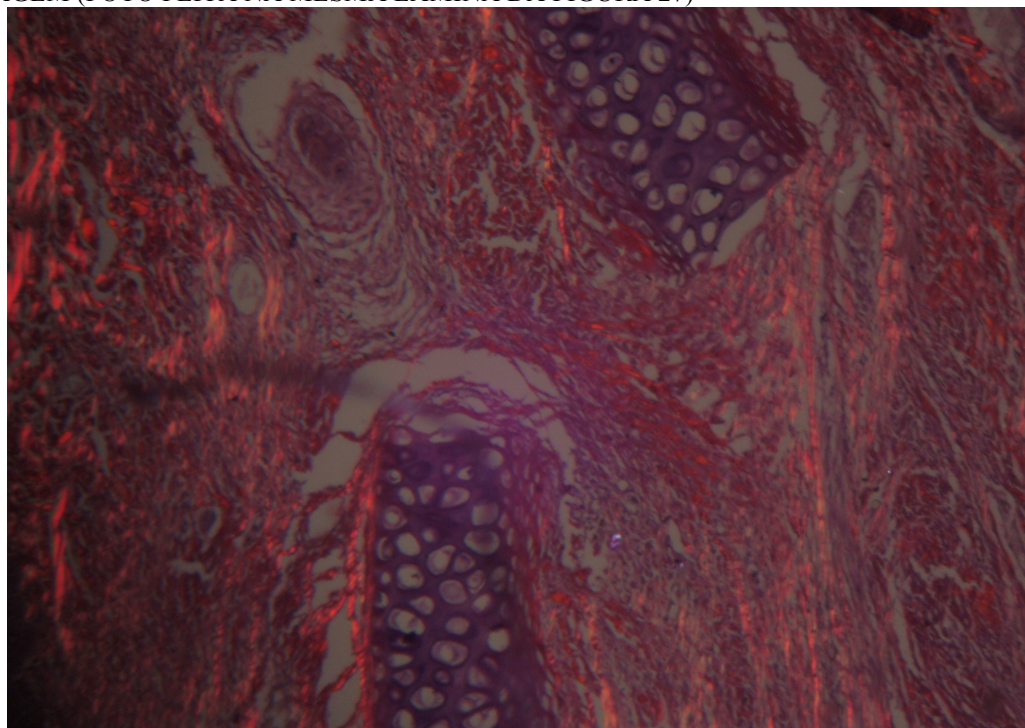
A quantidade de colágeno foi medida separadamente em três áreas: área peri-enxerto, aqui denominada borda, área de transição (Figura 27 e 28) e área do enxerto. Na comparação entre os grupos CX e SS, quando considerada toda a peça sem diferenciação da área, não houve diferença na quantidade de colágeno observada ($p=0,404$)(gráfico 11).

FIGURA 27 – FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELO PICRO-SÍRIUS NA ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE A BORDA E O ENXERTO, NÃO POLARIZADA, MOSTRANDO O PONTO DE CORTE DA CARTILAGEM.



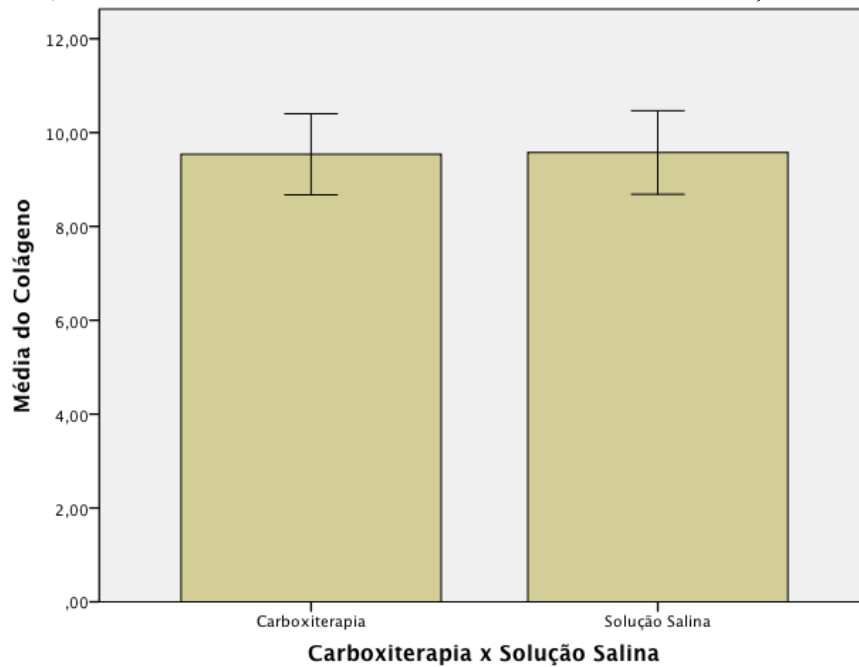
FONTE: O autor (2012)

FIGURA 28 - FOTOGRAFIA DA LÂMINA CORADA PELO PICRO-SÍRIUS NA ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE A BORDA E O ENXERTO, POLARIZADA, MOSTRANDO O PONTO DE CORTE DA CARTILAGEM (FOTO FEITA NA MESMA LÂMINA DA FIGURA 27)



FONTE: O autor (2012)

GRÁFICO 11 – PERCENTUAIS DE COLÁGENO CALCULADOS NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, CONFORME O USO DA CARBOXITERAPIA OU DA SOLUÇÃO SALINA.



$$p=0,404$$

FONTE: O autor (2012)

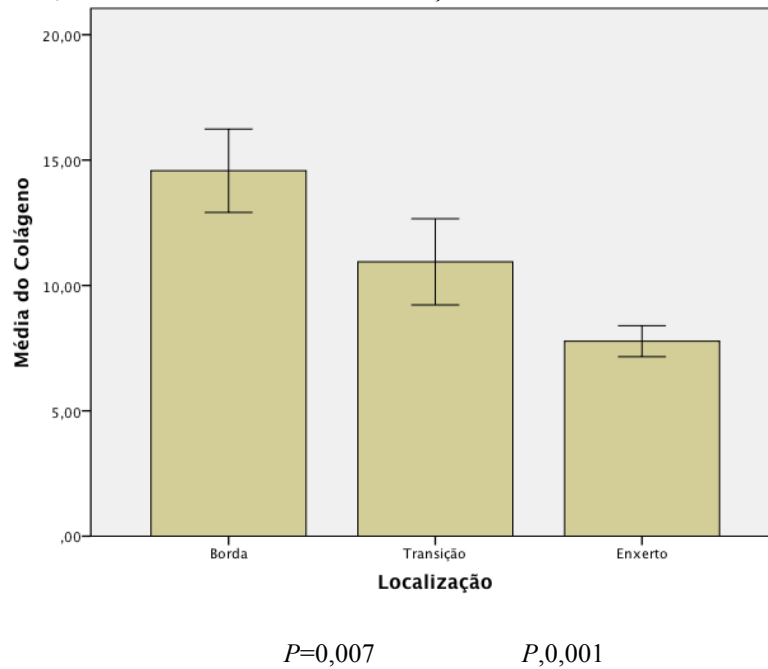
Avaliando as diferentes áreas, a quantidade de colágeno na borda é maior quando comparada a área de transição ($p=0,007$). Assim como é significativa a diferença da quantidade de colágeno da borda quando comparado com a quantidade no enxerto ($p<0,001$) e também da transição em relação ao enxerto ($p<0,001$)(tabela 8)(gráfico 12).

TABELA 8 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA QUANTIDADE DE COLÁGENO NAS DIFERENTES ÁREAS DE ACORDO COM O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.

	Grupo CX + SS	Grupo CX (carboxiterapia)	Grupo SS (solução salina)
Borda	14,57 ± 8,43	14,78 ± 7,52	14,39 ± 9,21
Transição	10,94 ± 6,7	12,23 ± 7,55	9,92 ± 5,86
Enxerto	7,77 ± 5,74	7,40 ± 4,73	8,08 ± 6,45

FONTE: O autor (2012)

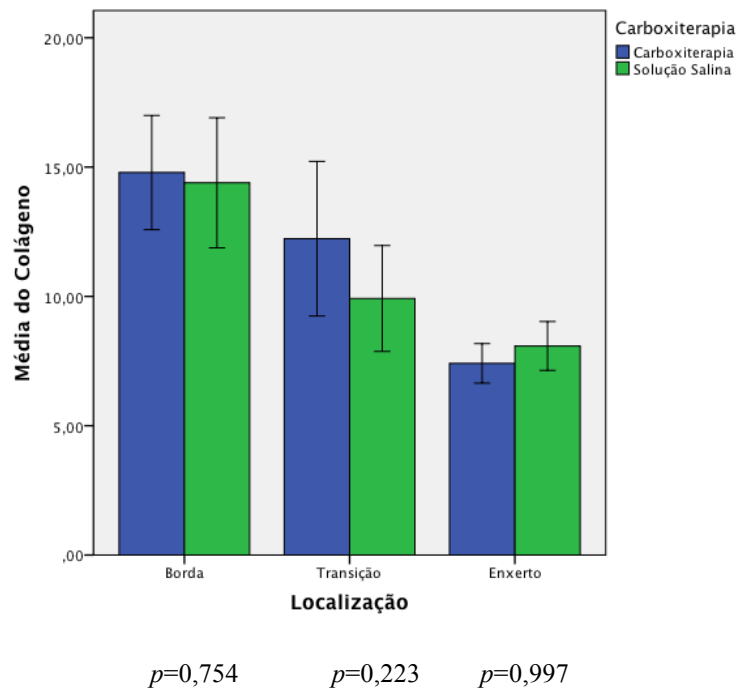
GRÁFICO 12 – MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO PRESENTE NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES.



FONTE: O autor (2012)

A análise da quantidade de colágeno em cada área sob a influência da carboxiterapia ou solução salina, não mostrou diferença significativa: na borda, $p=0,754$; no enxerto, $p=0,997$ e na transição, $p=0,223$ (gráfico 13).

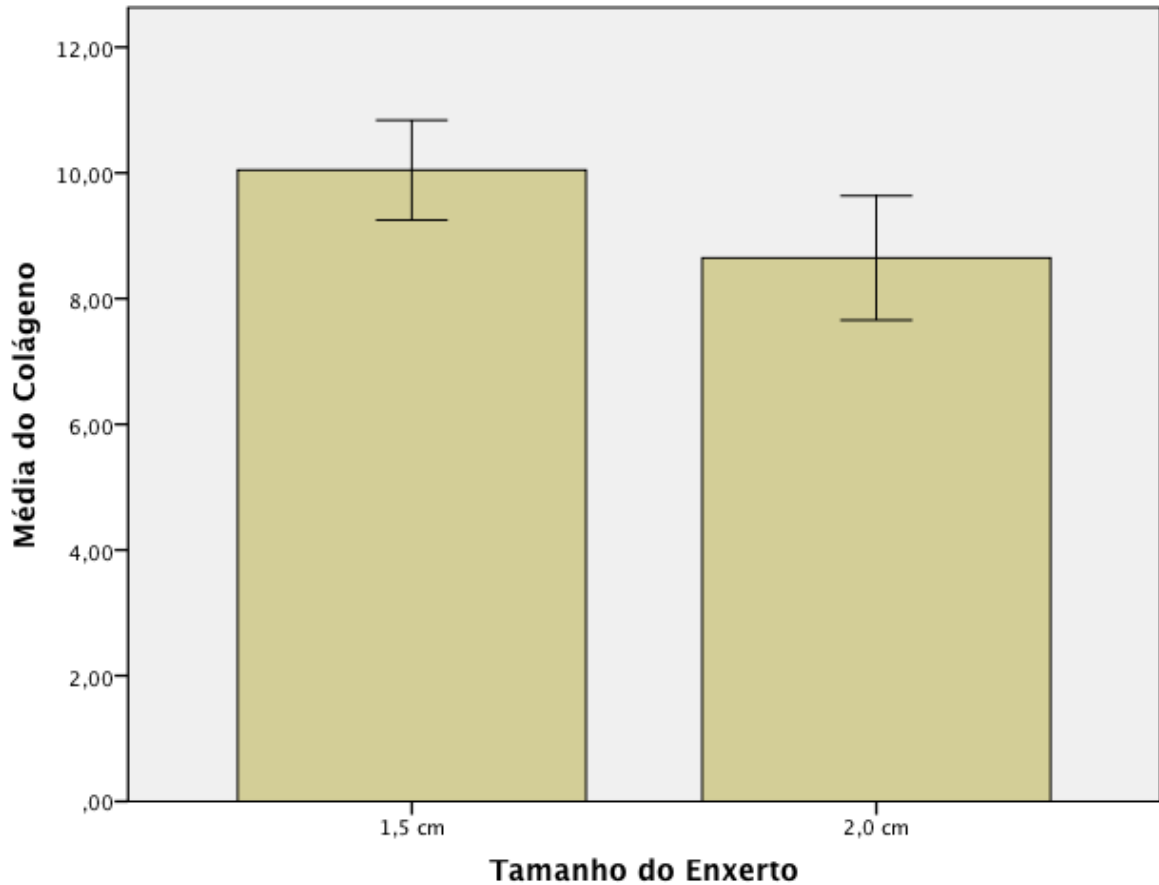
GRÁFICO 13 – MÉDIA E VALORES INTERVALARES DA QUANTIDADE DE COLÁGENO EM CADA ÁREA CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA



FONTE: O autor (2012)

O tamanho do enxerto teve influência na quantidade de colágeno, sendo esta maior nas peças cujo enxerto tinha 1,5 cm de diâmetro. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,043$)(gráfico 14).

GRÁFICO 14 – MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS, DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO.

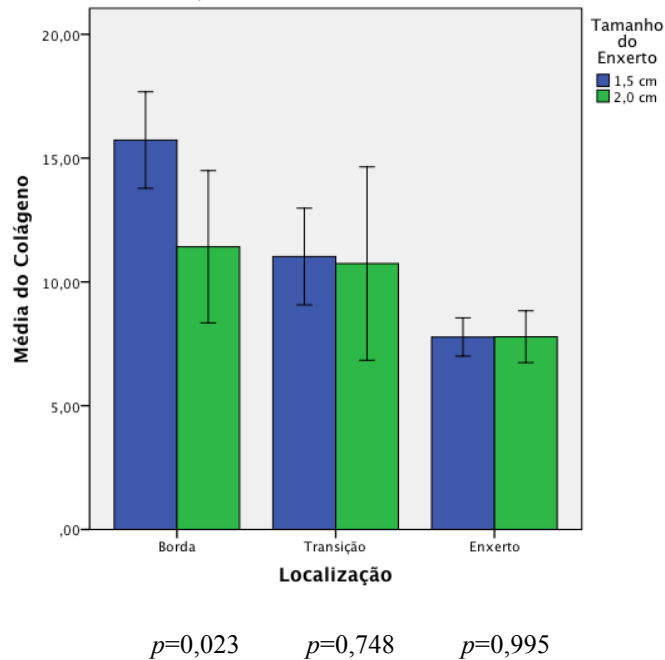


$p=0,043$

FONTE: O autor (2012)

Porém, ao analisarmos separadamente as diferentes áreas, observamos que esta diferença ocorreu devido à diferença na borda ($p=0,023$), pois na transição ($p=0,748$) e no enxerto ($p=0,995$), não houve diferença significativa na quantidade de colágeno quando comparados os enxertos de 1,5 cm de diâmetro com os enxertos de 2 cm de diâmetro (gráfico 15).

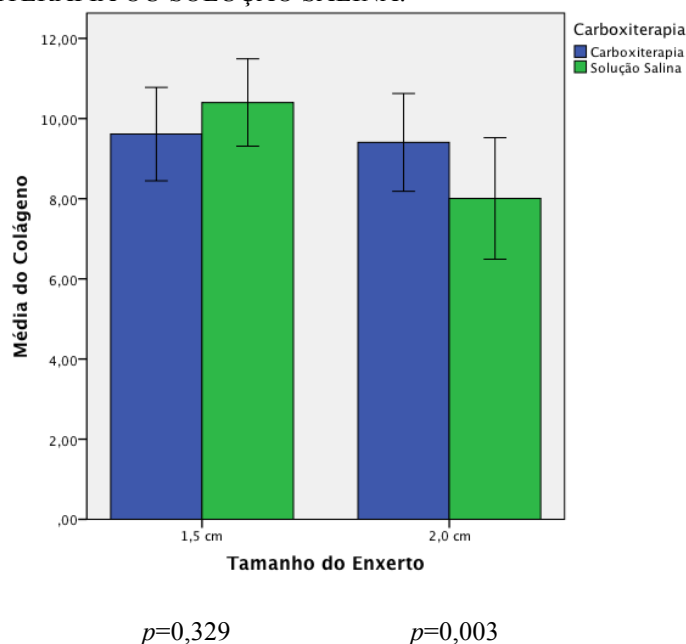
GRÁFICO 15 – MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS DIFERENTES ÁREAS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS, DE ACORDO COM O TAMANHO DO ENXERTO CONDROCUTÂNEO.



FONTE: O autor (2012)

Entre os enxertos de 1,5 cm, o uso de solução salina ou carboxiterapia não alterou a quantidade de colágeno ($p=0,329$). Porém, no enxerto de 2 cm, o uso da carboxiterapia aumentou a quantidade de colágeno quando comparado com a solução salina ($p=0,003$)(gráfico 16).

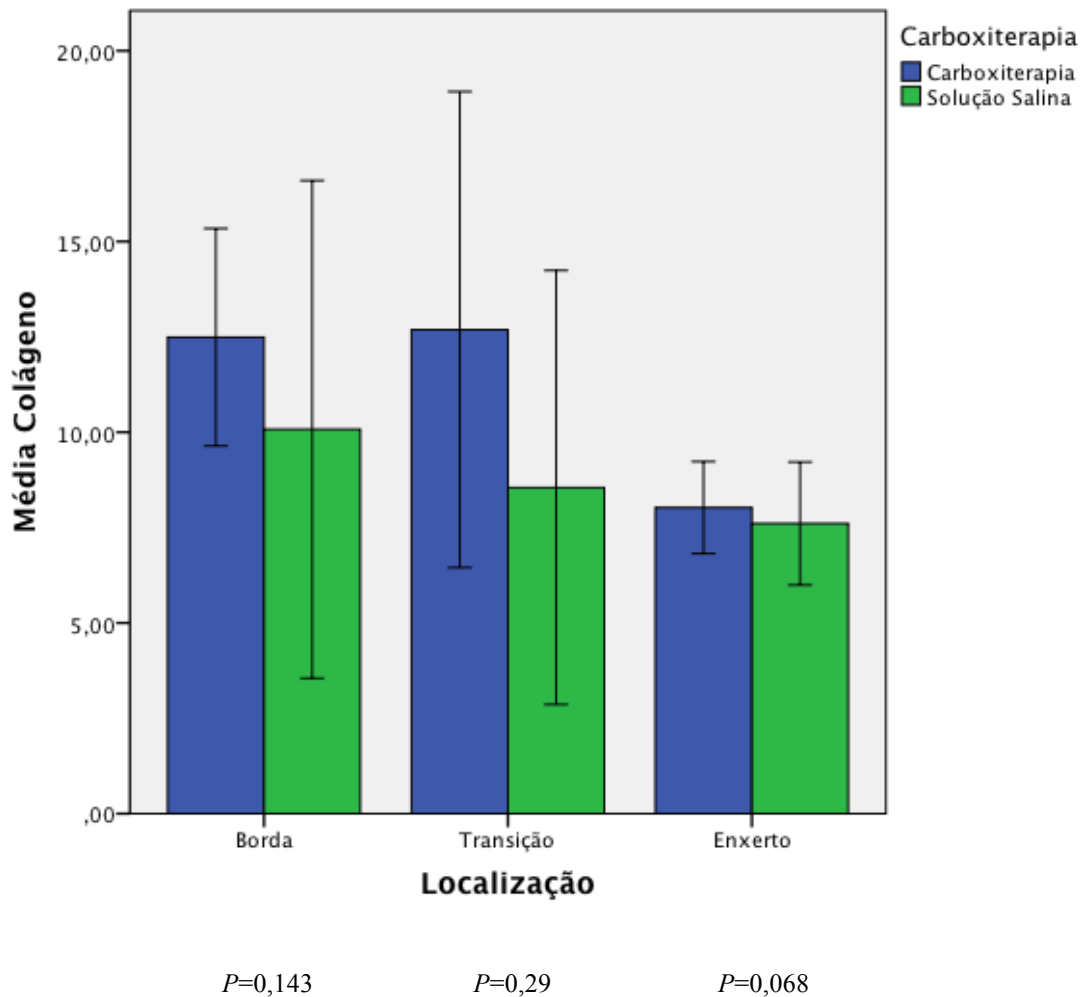
GRÁFICO 16 – MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS NOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS DE 1,5 CM E 2 CM DE DIÂMETRO CONFORME O USO DE CARBOXITERAPIA OU SOLUÇÃO SALINA.



FONTE: O autor (2012)

Considerando somente os enxertos de 2 cm, a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa na quantidade de colágeno, nas diferentes localizações estudadas: borda, $p=0,143$; transição, $p=0,29$; enxerto, $p=0,068$ (Gráfico 17).

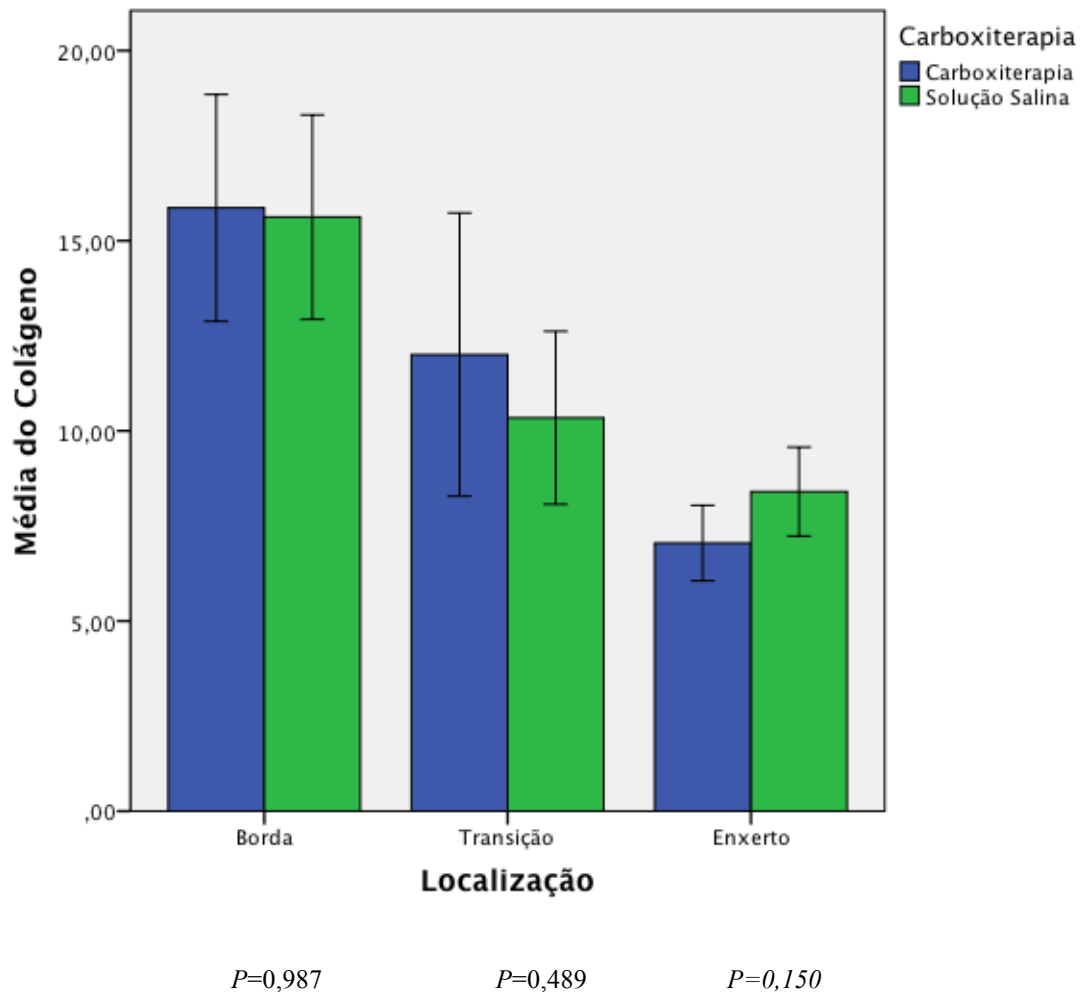
GRÁFICO 17 – COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS DE 2 CM, CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.



FONTE: O autor (2012)

Nos enxertos de 1,5 cm, também não houve diferença na quantidade de colágeno entre os grupos CX e SS, na borda ($p=0,987$), transição ($p=0,489$) e enxerto ($p=0,150$) (Gráfico 18).

GRÁFICO 18 - COMPARAÇÃO DA MÉDIA DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS NAS DIFERENTES LOCALIZAÇÕES DOS ENXERTOS CONDROCUTÂNEOS DE 1,5 CM, CONFORME O USO OU NÃO DA CARBOXITERAPIA.



FONTE: O autor (2012)

5 DISCUSSÃO

A carboxiterapia tem sido amplamente utilizada em diferentes especialidades médicas como opção de tratamento quando se deseja aumentar a microcirculação, a oxigenação tecidual e diminuir a flacidez cutânea. No entanto, não existem estudos que documentem a ação desta modalidade terapêutica.

Analisando o peso dos animais dos dois grupos, verificamos que os grupos eram comparáveis no início do experimento e observamos que o grupo submetido a carboxiterapia teve um ganho de peso significativamente menor que os animais do grupo submetido à infiltração de solução salina. Por se tratar de animais jovens, ainda em fase de crescimento, era esperado, como ocorreu, que todos os animais ganhassem peso durante o experimento. A influência da carboxiterapia no ganho de peso não era objeto do presente estudo, mas este achado é intrigante e gera questionamentos para futuros experimentos. Em 2010, um estudo que avaliava a carboxiterapia para o tratamento de celulite, mostrou que as pacientes do sexo feminino tiveram uma perda significativa de peso (LEE, G.S.K., 2010). O que surpreende no presente estudo é o fato da carboxiterapia realizada exclusivamente nas orelhas interferir no ganho de peso do animal.

No presente estudo, a média do percentual de pega total calculado a partir da face externa das orelhas no grupo com carboxiterapia foi de 90,2% nos enxertos de 1,5 cm e 80,79% nos enxertos de 2 cm. No grupo em que foi injetada solução salina, a média do percentual de pega total foi de 92,70% nos enxertos de 1,5 cm de diâmetro e 82,45% nos enxertos de 2 cm de diâmetro. Apesar de não termos observado diferença significativa no percentual de pega total no grupo submetido a carboxiterapia, observamos que o percentual de pega foi alto quando comparado aos índices relatados em outros estudos que utilizaram o mesmo modelo animal.

Em um estudo que avaliava o uso da oxigenoterapia hiperbárica no enxerto composto auricular em coelhos, foi obtida uma média de 85,8% de pega dos enxertos no grupo submetido a oxigenoterapia hiperbárica e 51,31% de pega no grupo controle, utilizando enxertos circulares de 2 cm de diâmetro, com a mesma localização do presente estudo (LI, E.N.; MENON, N.G.; RODRIGUES, E.D., 2004).

Em outro estudo que avaliava o uso da oxigenoterapia hiperbárica no enxerto composto auricular em coelhos, foi obtido um percentual de pega total de 80,67%, em média, no grupo tratado, enquanto o grupo controle apresentou um percentual de 26,33% , em média. Este estudo usou enxertos semi-circulares, de 2 cm por 1 cm na borda livre da orelha – o quê pode

ter dificultado a pega (LEWIS,D.; GOLDZTEIN, H.; DESCHLER, D., 2006).

É possível que as múltiplas punções e a distensão provocadas tanto pela solução salina quanto pela carboxiterapia tenham influenciado positivamente na pega dos enxertos, o que explicaria o alto percentual de pega dos enxertos do estudo como um todo.

Fato semelhante pode ser observado em um estudo experimental em ratos que avaliava a carboxiterapia no tratamento da gordura localizada. Este estudo tinha cinco grupos: o grupo “Sham”, o grupo dos efeitos agudos do CO₂, o grupo dos efeitos agudos do ar ambiente, o grupo dos efeitos crônicos do CO₂ e o grupo dos efeitos crônicos do ar ambiente. Foi observada diminuição no volume dos adipócitos no grupo submetido cronicamente a carboxiterapia quando comparado a insuflação de ar ambiente. No entanto, quando comparado o grupo submetido a infusão crônica do ar ambiente com o grupo “Sham”, também foi encontrada diminuição no volume dos adipócitos estatisticamente significativa. Este achado sugere a existência de um efeito mecânico na infusão dos gases. Além disso, na avaliação histológica, foi encontrado aumento do colágeno, da atividade de fibroblastos e da vascularização nos grupos que avaliavam as alterações crônicas provocadas pela carboxiterapia e pela insuflação de ar ambiente. Neste estudo, os efeitos provocados pela carboxiterapia eram superiores ao ar ambiente, mas ambos eram significantes em relação ao grupo sem nenhuma infiltração (BALIK, O.; YILMAZ, M.; BAGRIYANIK, A., 2011). Se o efeito mecânico da distensão existe, ele pode ser causado também pela infiltração da solução salina.

Como era esperado, o tamanho do enxerto influenciou no percentual de pega. Os enxertos de 1,5 cm apresentaram maior percentual de integração quando comparados aos enxertos de 2 cm. Converse, em 1969, já havia mostrado que quanto menor o tamanho de um enxerto cutâneo maior a pega, sendo esperado comportamento semelhante para os enxertos compostos (CONVERSE, M.J.; UHLSCHMID, G.K.; BALLANTINE Jr, D.L., 1969).

Foi observada diferença no percentual de pega dos enxertos dependendo da face da orelha a partir da qual o cálculo era feito. A pega quando analisada a partir da face externa da orelha foi maior. A explicação encontrada para o fato está na anatomia das orelhas do coelho cuja face externa apresenta um tecido subcutâneo e uma vascularização maior, enquanto a pele, na face interna está mais aderida à cartilagem. Esta diferença dificulta a comparação do percentual de pega dos enxertos de diferentes estudos, já que nos estudos consultados não foi relatada a face da orelha utilizada para os cálculos.

A carboxiterapia aumentou a quantidade de colágeno nos enxertos de 2 cm quando comparada à infiltração de solução salina, o que não foi observado nos enxertos de 1,5 cm.

Estes achados estão de acordo com outros estudos que mostraram aumento no “turnover” do colágeno em ratos submetidos a carboxiterapia quando comparados com ratos submetidos a infiltração de soro fisiológico, além de uma compactação das fibras colágenas que tornava o arranjo do colágeno nos ratos idosos bastante semelhante ao encontrado nos animais mais jovens (FERREIRA, J.C.T.; HADDAD, A.; TAVARES, S.A.N., 2008).

Não foi observada diferença entre os grupos em relação ao tipo de colágeno. Ficou clara, no entanto, uma diferença na quantidade de colágeno nas diferentes áreas avaliadas. A área peri-enxerto foi a que apresentou a maior quantidade, seguida pela área de transição, finalizando com a área do enxerto com a menor quantidade de colágeno. Este achado faz sentido, a partir do momento em que percebemos que a área com maior concentração de colágeno corresponde à área de melhor vascularização.

Foi observada ainda maior quantidade de colágeno nas áreas peri-enxerto nas orelhas dos coelhos com enxertos condrocútâneos de 1,5 cm de diâmetro, quando comparadas às áreas peri-enxerto dos enxertos de 2 cm de diâmetro. A melhor vascularização das orelhas submetidas aos menores enxertos pode ser a explicação para estes achados.

No estudo histopatológico das peças cirúrgicas não foi observada diferença entre os grupos, o que não reproduz resultados de outros estudos na literatura, em que foram observados aumento de celularidade, aumento da neovascularização e do número de folículos pilosos (BALIK, O.; YILMAZ, M.; BAGRIYANIK, A., 2011; BRANDI, C. et al., 2001; FABRY, R. et al., 2009; FERREIRA, J.C.T.; HADDAD, A.; TAVARES, S.A.N., 2008). No entanto, nestes estudos, a análise foi feita em tecidos vascularizados e não em enxertos. Esta diferença de comportamento dos tecidos melhor vascularizados ficou clara ao observarmos a distribuição do colágeno nas diferentes áreas das peças cirúrgicas, com uma diminuição progressiva da quantidade à medida que diminuía a vascularização do tecido.

SÖNMEZ, A., YAMAN, M. e YALÇIN, Ö. (2009), em estudo que avaliava o uso da carboxiterapia em retalhos cutâneos comparado à infiltração de ar ambiente, não observaram diferença entre os grupos no que se refere à área de retalho viável, mas verificaram aumento no número de capilares, fibroblastos e mastócitos no grupo submetido a carboxiterapia. Deve-se salientar, no entanto, que no estudo foram avaliados retalhos cutâneos e não enxertos compostos como na presente pesquisa.

A ausência de diferença significativa no estudo histopatológico dos dois grupos pode ser explicada, ainda, pelo possível efeito causado pela infiltração de solução salina que pode ter influenciado a celularidade e a vascularização do grupo controle, no presente estudo. Com isso, apesar de podermos concluir que a carboxiterapia não alterou a pega dos enxertos quando

comparada a infiltração de solução salina, é possível que ambos os grupos tenham sido afetados pela distensão mecânica favorecendo a pega dos enxertos, no estudo como um todo. Esta dúvida poderia ser esclarecida num novo estudo que contasse com um grupo submetido a insuflação de ar ambiente e um grupo sem qualquer infiltração.

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi realizado, a carboxiterapia interferiu na quantidade de colágeno nos enxertos de 2,0 cm de diâmetro, mas não aumentou a taxa de integração de enxertos condrocitâneos, quando comparada a infiltração de solução salina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMO, A.C. **Infusão controlada do co2**: carboinsuflação. São Paulo Ed. Do Autor 2010.
- ABRAMO, A.C.; TEIXEIRA, T.T. Carboinsuflação em úlceras crônicas dos membros inferiores. **Rev.Bras. Cir. Plást** 2011; 26 (2): 105-210
- ARENA-DE-SOUZA, R.C.; CABRAL, R. M.; REIS, M. Intradermoterapia. Em: ARENA-DE-SOUZA, R. C.; GARCEZ,C. E.. **Temas de Medicina Estética**. 2a. ed. Porto Alegre: Nova Prova 2007; P.217-247
- ATIYEH, B.S.; IBRAHIM, A.E.; DIBO,S.A. Cosmetic mesotherapy: between scientific evidence, science fiction, and lucrative business. **Aesth Plast Surg** 2008; 32: 842-849
- BALIK,O.; YILMAZ,M.; BAGRIYANIK,A. Does carbon dioxide therapy really diminish localized adiposities? Experimental study with rats. **Aesth Plast Surg** 2011; 35:470-474
- BRANDI, C.; D'ANIELLO, C.; GRIMALDI, L.; BOSI, B.; DEI, I; LATTARULO, P. ALESSANDRINI, C. Carbon dioxide therapy in the treatment of localized adiposities: clinical study and histopathological correlations. **Aesthetic Plast Surg** 2001; May-Jun; 25(3):170-4.
- BRANDI, C.; D'ANIELLO, C.; GRIMALDI, L.; CAIAZZO, E.; STANGHELLINI, E. Carbon dioxide therapy: effects on skin irregularity and its use as a complement to liposuction. **Aesth Plast Surg** 2004; 28:222-225
- BRANDI,C.; GRIMALDI,L.; NISI, G. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. **In Vivo** 2010; 24:223-226
- BROCKOW, T.; HAUSNER, M.D.; DILLNER, A.; RESCH,M.D. Clinical evidence of subcutaneous CO₂ insufflations: a systematic review. **J Altern Complement Med** 2000; Oct; 6(5):391-403. Review.
- CONVERSE, M.J; UHLSCHMID, G.K.; BALLANTINE Jr, D.L. "Plasmatic circulation" in skin grafts: the phase of serum imbibition. **Plastic & Reconst Surg** 1969; May; 6(5):495-499
- DOCKHORN, L.F.; ZANINII, S.A.; MÉLEGA, J.M. Enxertos de pele. In: MÉLEGA, J.M.;ZANINI,S.A.;PSILLAKIS,J.M.. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética** 2a. ed.. São Paulo: MEDSI 1992; p. 35-42

FABRY, R.; MONNET, P.; SCHMIDT, J.; LUSSON, J.R.; CARPENTIER, P.H.; BAQUET, J.C.; DUBRAY, C. Clinical and microcirculatory effects of transcutaneous CO₂ therapy in intermittent claudication. Randomized double-blind clinical trial with a parallel design. **Vasa** 2009; Aug;38(3):213-24

FERREIRA, J.C.T; HADDAD, A.; TAVARES, S. A. N. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. **J Drugs Dermatol** 2008; Mar; 7(3): 201-206

FRANCO, C. C..Carboxiterapia. In: ARENA-DE-SOUZA, R. C.; GARCEZ,C. E. **Temas de Medicina Estetica** 2a. ed. Porto Alegre: Nova Prova. 2007. p.553-557

HARTMANN, B.R.; BASSENGE, E., PITTLER, M. Effect of carbon dioxide-enriched water and fresh water on the cutaneous microcirculating and oxygen tension in the skin of the foot. **Angiology** 1997; 48: 337

ISHIDA, J.; SHIROMA, E.H. Enxertos Compostos. In: MÉLEGA, J.M.;ZANINI,S.A.;PSILLAKIS,J.M.. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2a. ed.. São Paulo: MEDSI 1992. p. 43-48

ITO, T.; MOORE, J.I.; KOSS, M.C. Topical application of CO₂ increases skin blood flow. **J Invest Dermatol** 1989; Aug; 93(2):259-62.

JENSEN, F.B. Red blood cell ph, the bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. **Acta Physiol Scand** 2004; 182:215-227

LEE,G.S.K. Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Cellulite: An Audit of Clinical Practice. **Aesth Plast Surg** 2010; 34: 239-243

LEWIS, D.; GOLDZTEIN, H.; DESCHLER, D. Use of hyperbaric oxygen to enhance auricular composite graft survival in the rabbit model. **Arch Facial Plast Surg** 2006; 8: 310-313

LI, E.N.; MENON, N.G.; RODRIGUES, E.D. The effect of hyperbaric oxygen therapy on composite graft survival. **Annals of Plastic Surgery** 2004; Aug; 53(2): 141-145

MAMMUCARI, M.; GATTI, A.; MAGGIORI, S.; BARTOLETTI, C.A.; SABATO, A.F. Mesotherapy, definition, rationale and clinical role: a consensus report from the Italian Society of Mesotherapy. **Europ Rev Med and Pharmac Sc** 2011; (15) 682-694

MATARASO,A.; PFEIFER, T. M. Mesotherapy and injection lipolysis. **Clin Plastic Surg** 2009; (36) 181-192

NACH, R. et al. Subcutaneous carboxytherapy injection for aesthetic improvement of scars. **Ear Nose Throat J** 2010; Feb 89 (2):64-6.

PIAZZOLLA, L. D. **Estudo da evolução de úlceras vasculares sob a ação de carboxiterapia**. Dissertação (mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

PIAZZOLLA, L.P., LOUZADA, L.L., SCORALICK, F.M., MARTINS, M.E., DE SOUSA, J.B. Preliminary Experience with Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Pressure Ulcers in a Bedridden Elderly Patient. **J Am Geriatr Soc** 2012; Feb;60(2):378-9.

SARKAR, R.; GARG, V.K.; MYSORE,V. Position paper on mesotherapy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology** 2011; March-April 77 (2):232-237

SATO, M.; KANIKOWSKA,D.; IWASE,S.; NISHIMURA, N.; SHIMIZU, Y.; BELIN DE CHANTEMELE, E.; MATSUMOTO, T.; INUKAI, Y. TANIGUCHI, Y.; OGATA, A.; SUGENOYA, J. Effects of Immersion in Water Containing High Concentrations of CO₂ (CO₂-water) at Thermoneutral on Thermoregulation and Heart Rate Variability in Humans. **Int J Biometeorol** 2009; 53:25-30

SÖNMEZ, A.; YAMAN, M.; YALÇIN, Ö. Carbon dioxide therapy increases capillary formation on random pedicled skin flaps in the rat. **Plast Reconst Aest Surg** 2009; 62, e236-e237

APÊNDICE A - PESO INICIAL E FINAL DOS COELHOS DO GRUPO A (CARBOXITERAPIA) E GRUPO B (SORO).

ANIMAL	GRUPO	PESO INICIAL	PESO FINAL
1	CARBOXI	2850	3100
2	SORO	2200	2550
3	CARBOXI	2300	2500
4	SORO	3200	3300
5	SORO	2550	2800
6	CARBOXI	2500	2800
7	SORO	2450	2800
8	CARBOXI	2600	2800
9	SORO	2400	3000
10	CARBOXI	2350	
11	SORO	2750	3500
12	CARBOXI	2700	2900
13	CARBOXI	1550	1900
14	SORO	1700	2400
15	CARBOXI	1750	
16	SORO	1600	2300
17	CARBOXI	1800	2400
18	SORO	1800	2600
19	CARBOXI	1400	1850
20	SORO	2000	2700

APÊNDICE B – ANÁLISE HISTOLÓGICA – ORELHA ESQUERDA – NEOVASOS, COLÁGENO, FIBROBLASTOS, MONONUCLEARES E HIPERPLASIA EPITELIAL

Coelho	Neovasos	Colágeno	Fibroblastos	Mononucleares	hiperplasia epitelial
1	++	++	+++	++	Presente
2	+++	++	+++	++	Presente
3	+++	++	+++	++	Presente
4	+++	++	+++	++	Presente
5	++	++	+++	++	Presente
6	++	++	+++	++	Presente
7	++	++	+++	++	Presente
8	++	++	+++	++	Presente
9	++	++	+++	++	Presente
11	++	++	+++	++	Presente
12	++	++	+++	++	Presente
13	++	++	+++	++	Presente
14	++	++	+++	++	Presente
16	++	++	+++	++	Presente
17	++	++	+++	++	Presente
18	+++	++	+++	++	Presente
19	+++	++	+++	++	Presente
20	+++	++	+++	++	Presente

APÊNDICE C – ANÁLISE HISTOLÓGICA – ORELHA ESQUERDA – FOLÍCULOS PILOSOS VIÁVEIS, NECROSE PARCIAL E ULCERAÇÃO DA PELE; NECROSE TOTAL DA PELE SEM PERFURAÇÃO; NE DA PELE COM PERFURAÇÃO; NECROSE DA CARTILAGEM

Coelho	folículos pilosos viáveis	necrose parcial e ulceração da pele	necrose total da pele sem perfuração	necrose total da pele com perfuração	necrose da cartilagem
1	presente	presente	ausente	ausente	presente
2	ausente	ausente	ausente	presente	presente
3	ausente	ausente	ausente	presente	presente
4	presente	presente	ausente	ausente	presente
5	ausente	ausente	presente	ausente	presente
6	presente	presente	ausente	ausente	presente
7	presente	presente	ausente	ausente	presente
8	presente	presente	ausente	ausente	presente
9	presente	ausente	ausente	ausente	presente
11	ausente	presente	ausente	ausente	presente
12	presente	presente	ausente	ausente	presente
13	presente	ausente	ausente	presente	presente
14	ausente	ausente	presente	presente	presente
16	presente	ausente	ausente	presente	presente
17	presente	ausente	ausente	presente	presente
18	presente	presente	ausente	ausente	presente
19	ausente	ausente	presente	ausente	presente
20	ausente	ausente	ausente	presente	presente

APÊNDICE D – ANÁLISE HISTOLÓGICA – ORELHA DIREITA – NEOVASOS, COLÁGENO, FIBROBLASTOS, MONONUCLEARES E HIPERPLASIA EPITELIAL

Coelho	Neovasos	Colágeno	Fibroblastos	Mononucleares	hiperplasia epitelial
1	++	++	+++	++	Presente
2	++	++	+++	++	Presente
3	++	++	+++	++	Presente
4	++	++	+++	++	Presente
5	++	++	+++	++	Presente
6	++	++	+++	++	Presente
7	++	++	+++	++	Ausente
8	++	++	+++	++	Presente
9	++	++	+++	++	Ausente
11	++	++	+++	++	Presente
12	++	++	+++	++	Presente
13	++	++	+++	++	Presente
14	++	++	+++	++	Presente
16	++	++	+++	++	Presente
17	++	++	+++	++	Presente
18	+++	++	+++	++	Presente
19	+++	++	+++	++	Presente
20	+++	++	+++	++	Presente

APÊNDICE E – ANÁLISE HISTOLÓGICA – ORELHA DIREITA– FOLÍCULOS PILOSOS VIÁVEIS, NECROSE PARCIAL E ULCERAÇÃO DA PELE; NECROSE TOTAL DA PELE SEM PERFURAÇÃO; NECROSE TOTAL DA PELE COM PERFURAÇÃO; NECROSE DA CARTILAGEM.

Coelho	folículos pilosos viáveis	necrose parcial e ulceração da pele	necrose total da pele sem perfuração	necrose total da pele com perfuração	necrose da cartilagem
1	ausente	ausente	ausente	presente	presente
2	ausente	ausente	ausente	presente	presente
3	ausente	ausente	ausente	presente	presente
4	ausente	presente	ausente	ausente	presente
5	ausente	presente	ausente	ausente	presente
6	ausente	presente	ausente	ausente	presente
7	ausente	presente	ausente	ausente	presente
8	presente	ausente	ausente	ausente	presente
9	ausente	ausente	ausente	presente	presente
11	presente	ausente	presente	ausente	presente
12	presente	presente	ausente	ausente	presente
13	presente	presente	ausente	ausente	presente
14	presente	ausente	ausente	ausente	presente
16	presente	ausente	ausente	ausente	presente
17	presente	ausente	ausente	ausente	presente
18	presente	presente	ausente	ausente	presente
19	ausente	presente	ausente	ausente	presente
20	ausente	presente	ausente	ausente	presente

APÊNDICE F - TIPO DE COLÁGENO NAS LÂMINAS

coelho	Orelha direita	Orelha esquerda
1	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
2	Colágeno tipo I	Colágeno tipo I
3	Colágeno tipo I	Colágeno tipo I e III
4	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
5	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
6	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
7	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
8	Colágeno tipo I	Colágeno tipo I e III
9	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
11	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
12	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
13	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I
14	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
16	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
17	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
18	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III
19	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo III
20	Colágeno tipo I e III	Colágeno tipo I e III

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J - CONTINUA

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
coelho 1	E	borda	122	6,8
coelho 1	E	borda	123	9,8
coelho 1	E	borda	124	4,8
coelho 1	E	borda	125	7,4
coelho 1	E	borda	129	6,9
coelho 1	E	borda	130	13,7
coelho 1	E	Transição	131	2,5
coelho 1	E	Transição	132	6,4
coelho 1	E	Enxerto	133	0,9
coelho 1	E	Enxerto	135	3,6
coelho 1	E	Enxerto	136	4,5
coelho 1	E	Enxerto	137	3
coelho 1	E	Enxerto	138	1,1
coelho 1	E	Enxerto	139	2,3
coelho 1	E	Enxerto	140	1,6
coelho 1	E	Enxerto	141	6,5
coelho 1	E	Enxerto	142	5,7
coelho 1	E	Enxerto	143	4,8
coelho 1	E	Enxerto	144	1,2
coelho 1	E	Enxerto	145	1,6
coelho 1	E	Enxerto	146	5,2
coelho 1	E	Enxerto	147	2,3
coelho 1	E	Enxerto	148	7,3
coelho 1	E	Borda	149	4,8
coelho 1	E	Borda	150	6,9
coelho 1	E	Borda	151	11,1
coelho 1	E	Borda	152	10,1
coelho 1	E	Borda	153	11,1

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 4	D	Borda	154	7,4
Coelho 4	D	Borda	155	14,3
Coelho 4	D	Transição	156	4
Coelho 4	D	Transição	157	10,9
Coelho 4	D	Transição	158	9,6
Coelho 4	D	enxerto	159	5,1
Coelho 4	D	enxerto	160	9
Coelho 4	D	enxerto	161	3,3
Coelho 4	D	enxerto	162	1,9
Coelho 4	D	enxerto	163	6,3
Coelho 4	D	enxerto	164	21,7
Coelho 4	D	enxerto	165	12,3
Coelho 4	D	enxerto	166	4,5
Coelho 4	D	enxerto	167	6,6
Coelho 4	D	enxerto	168	4,6
Coelho 4	D	enxerto	169	7,3
Coelho 4	D	enxerto	170	3,1
Coelho 4	D	enxerto	171	3,3
Coelho 4	D	enxerto	172	22,8
Coelho 4	D	enxerto	173	10,9
Coelho 4	D	enxerto	174	0,8
Coelho 4	D	enxerto	175	0,6
Coelho 4	D	enxerto	176	1,5
Coelho 4	D	enxerto	177	1,8
Coelho 4	D	enxerto	178	2,5
coelho 4	D	enxerto	179	1,4
Coelho 4	D	Transição	180	3,6
Coelho 4	E	Borda	182	1
Coelho 4	E	Borda	183	2,4

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 4	E	Borda	184	3
Coelho 4	E	Borda	185	1,3
Coelho 4	E	Transição	186	3,9
Coelho 4	E	Enxerto	187	2,4
Coelho 4	E	Enxerto	188	5,2
Coelho 4	E	Enxerto	189	6,2
Coelho 4	E	Enxerto	190	2
Coelho 4	E	Enxerto	191	1,7
Coelho 4	E	Enxerto	192	1,8
Coelho 4	E	Enxerto	193	0,4
Coelho 4	E	Enxerto	194	3,6
Coelho 4	E	Enxerto	195	3,6
Coelho 4	E	Enxerto	196	2,7
Coelho 4	E	Enxerto	197	2,1
Coelho 4	E	Enxerto	198	3,3
Coelho 4	E	Enxerto	199	8,3
Coelho 4	E	Enxerto	200	5,4
Coelho 4	E	Enxerto	201	10,1
Coelho 4	E	Enxerto	202	9,4
Coelho 4	E	Enxerto	203	8,9
Coelho 4	E	Transição	204	1,3
Coelho 6	E	Borda	205	3,1
Coelho 6	E	Borda	206	6,1
Coelho 6	E	Transição	207	6
Coelho 6	E	Enxerto	208	7,3
Coelho 6	E	Enxerto	209	7,4
Coelho 6	E	Enxerto	210	1,9
Coelho 6	E	Enxerto	211	4

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 6	E	Enxerto	212	6,6
Coelho 6	E	Enxerto	213	1,1
Coelho 6	E	Enxerto	214	6,1
Coelho 6	E	Enxerto	215	9,4
Coelho 6	E	Enxerto	216	1
Coelho 6	E	Enxerto	217	2,1
Coelho 6	E	Enxerto	218	4,2
Coelho 6	E	Enxerto	219	8,3
Coelho 6	E	Enxerto	220	5,7
Coelho 6	E	Enxerto	221	7,6
Coelho 6	E	Enxerto	222	8,6
Coelho 6	E	Enxerto	223	9,9
Coelho 6	E	Transição	224	10,8
Coelho 6	E	Transição	225	5,7
Coelho 6	E	borda	226	11,3
Coelho 6	E	borda	227	9,4
Coelho 6	E	borda	228	14,4
Coelho 6	E	borda	229	9
Coelho 6	D	borda	230	17
Coelho 6	D	Transição	231	10,3
Coelho 6	D	Enxerto	232	6,5
Coelho 6	D	Enxerto	233	8,4
Coelho 6	D	Enxerto	234	11,1
Coelho 6	D	Enxerto	235	6,9
Coelho 6	D	Enxerto	236	8,7
Coelho 6	D	Enxerto	237	11,8
Coelho 6	D	Enxerto	238	6,3
Coelho 6	D	Enxerto	239	3,7
Coelho 6	D	Enxerto	240	2

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 6	D	Enxerto	241	3,3
Coelho 6	D	Enxerto	242	6,1
Coelho 7	D	Borda	243	3,3
Coelho 7	D	Borda	244	14
Coelho 7	D	Borda	245	11,9
Coelho 7	D	Borda	246	18,8
Coelho 7	D	Borda	247	21,5
Coelho 7	D	Borda	248	11,4
Coelho 7	D	Transição	249	13,5
Coelho 7	D	Transição	250	9,7
Coelho 7	D	enxerto	251	11,2
Coelho 7	D	enxerto	252	11
Coelho 7	D	enxerto	253	8,9
Coelho 7	D	enxerto	254	13,7
Coelho 7	D	enxerto	255	9,2
Coelho 7	D	enxerto	256	6,9
Coelho 7	D	enxerto	257	11,4
Coelho 7	D	enxerto	258	8,6
Coelho 7	D	enxerto	259	8,2
Coelho 7	D	enxerto	260	8,8
Coelho 7	D	enxerto	261	15,1
Coelho 7	D	enxerto	262	7,3
Coelho 7	D	enxerto	263	19,9
Coelho 7	D	enxerto	264	9,5
Coelho 7	D	enxerto	265	23,8
Coelho 7	D	enxerto	266	4,4
Coelho 7	D	enxerto	267	23,4
Coelho 7	D	enxerto	268	20

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO MICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 7	D	enxerto	269	23,7
Coelho 7	D	enxerto	270	30,1
Coelho 7	D	Transição	271	14,3
Coelho 7	D	Transição	272	15,2
Coelho 7	D	Borda	273	20,4
Coelho 7	D	Borda	274	32,9
Coelho 7	D	Borda	275	17,4
Coelho 7	D	Borda	276	16,6
Coelho 7	D	Borda	277	28,7
Coelho 7	D	Borda	278	17,5
Coelho 7	D	Borda	279	23,9
Coelho 7	E	Borda	281	7,8
Coelho 7	E	Borda	282	14,6
Coelho 7	E	Borda	283	3,4
Coelho 7	E	Borda	284	6,2
Coelho 7	E	Borda	285	5,2
Coelho 7	E	Transição	286	7,7
Coelho 7	E	Transição	287	13,9
Coelho 7	E	Enxerto	288	15,1
Coelho 7	E	Enxerto	289	11,7
Coelho 7	E	Enxerto	290	6,3
Coelho 7	E	Enxerto	291	4,3
Coelho 7	E	Enxerto	292	4,4
Coelho 7	E	Enxerto	293	9,9
Coelho 7	E	Enxerto	294	3
Coelho 7	E	Enxerto	295	2,5
Coelho 7	E	Enxerto	296	2,1
Coelho 7	E	Enxerto	297	2,5

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 7	E	Enxerto	298	4,6
Coelho 7	E	Enxerto	299	4,1
Coelho 7	E	Enxerto	300	2,8
Coelho 7	E	Enxerto	301	3,2
Coelho 7	E	Enxerto	302	3,2
Coelho 7	E	Enxerto	303	3
Coelho 7	E	Enxerto	304	2,6
Coelho 7	E	Enxerto	305	1,8
Coelho 7	E	Enxerto	306	3,3
Coelho 7	E	Enxerto	307	3,2
Coelho 7	E	Enxerto	308	1,7
Coelho 7	E	Enxerto	309	4,5
Coelho 7	E	Enxerto	310	3,8
Coelho 7	E	Enxerto	311	6,6
Coelho 7	E	Enxerto	312	1,9
Coelho 7	E	Enxerto	313	8,9
Coelho 7	E	Enxerto	314	1,9
Coelho 7	E	Enxerto	315	2,8
Coelho 7	E	Transição	316	6,7
Coelho 7	E	Transição	317	4,5
Coelho 8	D	borda	318	14,2
Coelho 8	D	borda	319	16,2
Coelho 8	D	Transição	320	10,4
Coelho 8	D	Enxerto	321	6,5
Coelho 8	D	Enxerto	322	12,5
Coelho 8	D	Enxerto	323	6,7
Coelho 8	D	Enxerto	324	6,6
Coelho 8	D	Enxerto	325	10,3
Coelho 8	D	Enxerto	326	15,5

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 8	D	Enxerto	327	10,7
Coelho 8	D	Enxerto	328	9,9
Coelho 8	D	Enxerto	329	7,5
Coelho 8	D	Enxerto	330	6
Coelho 8	D	Enxerto	331	6,7
Coelho 8	D	Enxerto	332	7,5
Coelho 8	D	Enxerto	333	13,5
Coelho 8	D	Enxerto	334	12,6
Coelho 8	D	Enxerto	335	15,5
Coelho 8	D	Enxerto	336	6,1
Coelho 8	D	Enxerto	337	8,3
Coelho 8	D	Enxerto	338	18
Coelho 8	D	Transição	339	13,3
Coelho 8	D	Transição	340	16,2
Coelho 8	D	Borda	341	15,1
Coelho 8	D	Borda	342	16,9
Coelho 8	D	Borda	343	11,2
Coelho 8	D	Borda	344	20,3
Coelho 8	D	Borda	345	11,1
Coelho 9	E	Borda	346	23,6
Coelho 9	E	Borda	347	27,7
Coelho 9	E	Borda	348	29
Coelho 9	E	Borda	349	23,9
Coelho 9	E	Transição	350	23,2
Coelho 9	E	Transição	351	15,7
Coelho 9	E	Enxerto	352	16,6
Coelho 9	E	Enxerto	353	9,7
Coelho 9	E	Enxerto	354	13,2
Coelho 9	E	Enxerto	355	18,1

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 9	E	Enxerto	356	14,7
Coelho 9	E	Enxerto	357	9,5
Coelho 9	E	Enxerto	358	6,5
Coelho 9	E	Enxerto	359	10,5
Coelho 9	E	Enxerto	360	6,7
Coelho 9	E	Enxerto	361	24
Coelho 9	E	Enxerto	362	21,8
Coelho 9	E	Transição	363	18,1
Coelho 9	E	Transição	364	21
Coelho 9	E	Borda	365	22,7
Coelho 9	E	Borda	366	16,8
Coelho 9	E	Borda	367	18,5
Coelho 11	D	Borda	368	32,5
Coelho 11	D	Borda	369	19,9
Coelho 11	D	Borda	370	23,6
Coelho 11	D	Transição	371	22,7
Coelho 11	D	Transição	372	7,7
Coelho 11	D	Enxerto	373	6,4
Coelho 11	D	Enxerto	374	25,9
Coelho 11	D	Enxerto	375	27,1
Coelho 11	D	Enxerto	376	10,1
Coelho 11	D	Enxerto	377	36,9
Coelho 11	D	Enxerto	378	19,6
Coelho 11	D	Enxerto	379	17,3
Coelho 11	D	Enxerto	380	10
Coelho 11	D	Enxerto	381	11,2
Coelho 11	D	Enxerto	382	9,6
Coelho 11	D	Enxerto	383	8,5
Coelho 11	D	Enxerto	384	7,8

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 11	D	Enxerto	385	15,7
Coelho 11	D	Enxerto	386	12,3
Coelho 11	D	Enxerto	387	5,2
Coelho 11	D	Enxerto	388	5,9
Coelho 11	D	Enxerto	389	8,3
Coelho 11	D	Enxerto	390	5,6
Coelho 11	D	Enxerto	391	4,9
Coelho 11	D	Enxerto	392	9,1
Coelho 11	D	Enxerto	393	8,9
Coelho 11	D	Enxerto	394	4,3
Coelho 11	D	Enxerto	395	4,6
Coelho 11	D	Enxerto	396	4
Coelho 11	D	Enxerto	397	10,2
Coelho 11	D	Enxerto	398	16,6
Coelho 11	D	Enxerto	399	20,4
Coelho 11	D	Enxerto	400	26
Coelho 12	E	borda	401	13,2
Coelho 12	E	borda	402	19,1
Coelho 12	E	borda	403	22,5
Coelho 12	E	borda	404	11,6
Coelho 12	E	Transição	405	4,6
Coelho 12	E	Transição	406	15,1
Coelho 12	E	Enxerto	407	3,3
Coelho 12	E	Enxerto	408	9,6
Coelho 12	E	Enxerto	409	8,9
Coelho 12	E	Enxerto	410	1,9
Coelho 12	E	Enxerto	411	1,3
Coelho 12	E	Enxerto	412	7,5
Coelho 12	E	Enxerto	413	10,5

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 12	E	Enxerto	414	4,9
Coelho 12	E	Enxerto	415	6,7
Coelho 12	E	Enxerto	416	8
Coelho 12	E	Enxerto	417	12,8
Coelho 12	E	Enxerto	418	15,1
Coelho 12	E	Enxerto	419	11,8
Coelho 12	E	Transição	420	4,9
Coelho 12	E	Transição	421	25,7
Coelho 12	E	Borda	422	9,7
Coelho 12	E	Borda	423	16,5
Coelho 12	E	Borda	424	15,2
Coelho 12	E	Borda	425	8,8
Coelho 12	D	Borda	426	17,5
Coelho 12	D	Transição	427	21,1
Coelho 12	D	Transição	428	20,3
Coelho 12	D	Enxerto	429	9,5
Coelho 12	D	Enxerto	430	6,6
Coelho 12	D	Enxerto	431	8,8
Coelho 12	D	Enxerto	432	11,2
Coelho 12	D	Enxerto	433	6,8
Coelho 12	D	Enxerto	434	11,2
Coelho 12	D	Enxerto	435	9,1
Coelho 12	D	Enxerto	436	2,6
Coelho 12	D	Enxerto	437	11,4
Coelho 12	D	Enxerto	438	10,2
Coelho 12	D	Enxerto	439	3,9
Coelho 12	D	Enxerto	440	8,9
Coelho 12	D	Enxerto	441	8,9
Coelho 12	D	Enxerto	442	5,7

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 12	D	Enxerto	443	8,3
Coelho 12	D	Enxerto	444	8,5
Coelho 12	D	Enxerto	445	6
Coelho 12	D	Enxerto	446	6,4
Coelho 12	D	Enxerto	447	8,4
Coelho 12	D	Enxerto	448	14,3
Coelho 12	D	Enxerto	449	25,5
Coelho 12	D	Enxerto	450	14,4
Coelho 12	D	Enxerto	451	19,5
Coelho 12	D	Enxerto	452	10,8
Coelho 12	D	Enxerto	453	6,8
Coelho 12	D	Enxerto	454	4,2
Coelho 13	D	Borda	455	27,1
Coelho 13	D	Borda	456	29,8
Coelho 13	D	Borda	457	21,9
Coelho 13	D	Transição	458	21,9
Coelho 13	D	Transição	459	31,7
Coelho 13	D	Enxerto	460	21,7
Coelho 13	D	Enxerto	461	16,2
Coelho 13	D	Enxerto	462	18,4
Coelho 13	D	Enxerto	463	7,3
Coelho 13	D	Enxerto	464	14,8
Coelho 13	D	Enxerto	465	16,1
Coelho 13	D	Enxerto	466	15,6
Coelho 13	D	Enxerto	467	13,2
Coelho 13	D	Enxerto	468	3,7
Coelho 13	D	Enxerto	469	2,5
Coelho 13	D	Enxerto	470	14,2
Coelho 13	D	Enxerto	471	14,5

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 13	D	Enxerto	472	9,1
Coelho 13	D	Enxerto	473	14,4
Coelho 13	D	Enxerto	474	11,1
Coelho 13	D	Enxerto	475	13,6
Coelho 13	D	Enxerto	476	6,4
Coelho 13	D	Transição	477	18
Coelho 13	D	Transição	478	19,4
Coelho 13	D	borda	479	32,3
Coelho 14	D	borda	480	28,6
Coelho 14	D	borda	481	15
Coelho 14	D	borda	482	7,7
Coelho 14	D	borda	483	7,4
Coelho 14	D	borda	484	9,3
Coelho 14	D	Transição	485	5,2
Coelho 14	D	Transição	486	3,8
Coelho 14	D	Enxerto	487	8
Coelho 14	D	Enxerto	488	10,2
Coelho 14	D	Enxerto	489	8,3
Coelho 14	D	Enxerto	490	7,1
Coelho 14	D	Enxerto	491	8,6
Coelho 14	D	Enxerto	492	14,4
Coelho 14	D	Enxerto	393	15,8
Coelho 14	D	Enxerto	494	5,6
Coelho 14	D	Enxerto	495	7,6
Coelho 14	D	Enxerto	496	8,2
Coelho 14	D	Enxerto	497	6,9
Coelho 14	D	Enxerto	498	5,8
Coelho 14	D	Enxerto	499	5,1
Coelho 14	D	Enxerto	500	7

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 14	D	Enxerto	501	5,7
Coelho 14	D	Enxerto	502	12,2
Coelho 14	D	Enxerto	503	15,6
Coelho 14	D	Transição	504	13
Coelho 14	D	Transição	505	14,8
Coelho 16	D	Borda	506	17,2
Coelho 16	D	Borda	507	24,5
Coelho 16	D	borda	508	25,4
Coelho 16	D	Transição	510	13,6
Coelho 16	D	Transição	511	3,4
Coelho 16	D	Enxerto	512	8,3
Coelho 16	D	Enxerto	513	3
Coelho 16	D	Enxerto	514	2,9
Coelho 16	D	Enxerto	515	8,9
Coelho 16	D	Enxerto	516	7,3
Coelho 16	D	Enxerto	517	3,6
Coelho 16	D	Enxerto	518	4,8
Coelho 16	D	Enxerto	519	2,3
Coelho 16	D	Enxerto	520	6,4
Coelho 16	D	Enxerto	521	7,2
Coelho 16	D	Enxerto	522	4,7
Coelho 16	D	Enxerto	523	5,1
Coelho 16	D	Enxerto	524	9,5
Coelho 16	D	Enxerto	525	5,5
Coelho 16	D	Enxerto	526	7
Coelho 16	D	Enxerto	527	7,9
Coelho 16	D	Transição	528	10,7
Coelho 16	D	Borda	529	17,7
Coelho17	D	Borda	530	29,3

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho17	D	Borda	531	26,5
Coelho17	D	Borda	532	20,6
Coelho17	D	Transição	533	10,8
Coelho17	D	Transição	534	5,1
Coelho17	D	Enxerto	535	10,3
Coelho17	D	Enxerto	536	6,8
Coelho17	D	Enxerto	537	2,8
Coelho17	D	Enxerto	538	7,5
Coelho17	D	Enxerto	539	6,5
Coelho17	D	Enxerto	540	6,1
Coelho17	D	Enxerto	541	6,8
Coelho17	D	Enxerto	542	5,8
Coelho17	D	Enxerto	543	7,9
Coelho17	D	Enxerto	544	1,4
Coelho17	D	Enxerto	545	0,9
Coelho17	D	Enxerto	546	4,4
Coelho17	D	Enxerto	553	0,9
Coelho17	D	Enxerto	554	0,5
Coelho17	D	Transição	555	4,8
Coelho17	D	Transição	556	4,9
Coelho17	D	Borda	557	9,1
Coelho17	D	Borda	558	6,1
Coelho18	D	Borda	559	8,4
Coelho18	D	Transição	560	5,8
Coelho18	D	Enxerto	561	2,9
Coelho18	D	Enxerto	562	3
Coelho18	D	Enxerto	563	2,1
Coelho18	D	Enxerto	564	4,6
Coelho18	D	Enxerto	565	4,9

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SÍRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho18	D	Enxerto	566	3
Coelho18	D	Enxerto	567	2,1
Coelho18	D	Enxerto	568	8,3
Coelho18	D	Enxerto	569	9,7
Coelho18	D	Enxerto	570	4,5
Coelho18	D	Enxerto	571	1,5
Coelho18	D	Enxerto	572	6,5
Coelho18	D	Transição	573	8
Coelho18	D	Transição	574	7,9
Coelho18	D	borda	575	9,6
Coelho18	D	borda	576	5,7
Coelho18	D	borda	577	1,8
Coelho18	D	borda	578	5
Coelho18	D	borda	579	4,1
Coelho18	D	borda	580	3,7
Coelho 19	D	borda	581	16,3
Coelho 19	D	borda	582	17,9
Coelho 19	D	Transição	583	6,5
Coelho 19	D	Transição	584	10,2
Coelho 19	D	Transição	585	7,1
Coelho 19	D	Enxerto	586	9
Coelho 19	D	Enxerto	587	5,8
Coelho 19	D	Enxerto	588	4,6
Coelho 19	D	Enxerto	589	7
Coelho 19	D	Enxerto	590	5,8
Coelho 19	D	Enxerto	591	6,3
Coelho 19	D	Enxerto	592	3,3
Coelho 19	D	Enxerto	593	1,4
Coelho 19	D	Enxerto	594	3,9

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO MICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 19	D	Enxerto	595	2,9
Coelho 19	D	Enxerto	596	1,2
Coelho 19	D	Enxerto	597	2,5
Coelho 19	D	Enxerto	598	1
Coelho 19	D	Enxerto	599	0,5
Coelho 19	D	Enxerto	600	1,7
Coelho 19	D	Enxerto	601	1,9
Coelho 19	D	Enxerto	602	2
Coelho 19	D	Enxerto	603	7,4
Coelho 19	D	Enxerto	604	2,2
Coelho 19	D	Enxerto	605	11,4
Coelho 19	D	Transição	606	16,6
Coelho 19	D	Borda	607	27,1
Coelho 19	D	Borda	608	28,3
Coelho 20	D	Borda	609	2,8
Coelho 20	D	Borda	610	2,2
Coelho 20	D	Transição	611	10,1
Coelho 20	D	Transição	612	4,5
Coelho 20	D	Enxerto	613	4,4
Coelho 20	D	Enxerto	614	1,6
Coelho 20	D	Enxerto	615	7,4
Coelho 20	D	Enxerto	616	2,2
Coelho 20	D	Enxerto	617	1,1
Coelho 20	D	Enxerto	618	11,2
Coelho 20	D	Enxerto	619	14,5
Coelho 20	D	Enxerto	620	6,8
Coelho 20	D	Enxerto	621	2,9
Coelho 20	D	Enxerto	622	4,7
Coelho 20	D	Enxerto	623	0,8

APÊNDICE G – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS CALCULADO COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – CONTINUAÇÃO

Coelho	Orelha	Localização	Foto	Percentual de colágeno
Coelho 20	D	Enxerto	624	0,8
Coelho 20	D	Transição	625	3,9
Coelho 20	D	Transição	626	5,4
Coelho 20	D	Borda	627	16,2
Coelho 20	D	Borda	628	21,7

APÊNDICE H – ÁREAS DO ENXERTO EM CM² CALCULADAS PELAS FOTOGRAFIAS COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – FACE INTERNA – CONTINUA

FACE INTERNA								
coelho	Grupo	Tamanho do enxerto	área total 1	área total 2	pega parcial 1	pega parcial 2	necrose total 1	necrose total 2
1	carboxi	1,5 cm	0,774	0,801	N	N	N	N
1	carboxi	2 cm	1,821	1,896	0,808	0,86	0,89	0,972
2	soro	1,5 cm	1,334	1,253	0,231	0,221	0,102	0,15
2	soro	2 cm	2,455	2,377	N	N	0,613	0,665
3	carboxi	2 cm	2,424	2,418	0,599	0,567	0,306	0,26
3	carboxi	1,5 cm	1,291	1,511	0,175	0,134	0,263	0,276
4	soro	2 cm			N	N	N	N
4	soro	1,5 cm			N	N	N	N
5	soro	2 cm	2,398	2,332	0,626	0,627	0,135	0,137
5	soro	1,5 cm	1,323	1,262	0,21	0,225	N	N
6	carboxi	2 cm	1,809	1,818	0,35	0,342	N	N
6	carboxi	1,5 cm	1,355	1,352	0,156	0,155	N	N
7	soro	2 cm	2,685	2,701	0,286	0,283	N	N
7	soro	1,5 cm	1,304	1,3	0,173	0,161	N	N
8	carboxi	2 cm	2,63	2,612	0,862	0,927	N	N
8	carboxi	1,5 cm	1,347	1,363	0,093	0,094	N	N
9	soro	1,5 cm	1,655	1,583	0,16	0,149	N	N
9	soro	2 cm	3,209	3,17	0,872	0,786	0,513	0,48
11	soro	1,5 cm	1,182	1,167	0,124	0,142	N	N
11	soro	2 cm	2,609	2,613	0,664	0,679	N	N
12	carboxi	1,5 cm	1,485	1,464	0,446	0,454	N	N
12	carboxi	2 cm	2,753	2,763	0,912	0,929	N	N
13	carboxi	2 cm	3,322	3,318	0,47	0,467	0,368	0,383
13	carboxi	1,5 cm	1,196	1,225	0,079	0,073	N	N
14	soro	2 cm	2,732	2,787	0,811	0,84	N	N
14	soro	1,5 cm	1,46	1,482	0,224	0,196	N	N
16	soro	2 cm	2,833	2,813	N	N	0,874	0,748
16	soro	1,5 cm	1,485	1,508	0,051	0,053	N	N
17	carboxi	2 cm	3,489	3,458	0,502	0,462	0,555	0,576

APÊNDICE H – ÁREAS DO ENXERTO EM CM² CALCULADAS PELAS FOTOGRAFIAS COM O
AUXÍLIO DO IMAGE J – FACE INTERNA – CONTINUAÇÃO

FACE INTERNA								
coelho	Grupo	Tamanho do enxerto	área total 1	área total 2	pega parcial 1	pega parcial 2	necrose total 1	necrose total 2
17	carboxi	1,5 cm	1,64	1,749	0,231	0,219	N	N
18	soro	2 cm	3,204	3,297	0,689	0,712	N	N
18	soro	1,5 cm	1,607	1,597	0,093	0,095	N	N
19	carboxi	2 cm	2,494	2,498	0,517	0,509	N	N
19	carboxi	1,5 cm	1,398	1,324	0,089	0,089	N	N
20	soro	2 cm	2,834	2,586	0,613	0,637	0,511	0,538
20	soro	1,5 cm	0,862	0,934	0,2	0,177	N	N

APÊNDICE I – ÁREAS DO ENXERTO EM CM² CALCULADAS PELAS FOTOGRAFIAS COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – FACE EXTERNA - CONTINUA

FACE EXTERNA								
coelho	Grupo	Tamanho do enxerto	área total 1	área total 2	pega parcial 1	pega parcial 2	necrose total 1	necrose total 2
1	carboxi	1,5 cm	0,823	0,779	0,028	0,035	N	N
1	carboxi	2 cm	1,852	2,024	0,259	0,241	0,518	0,476
2	soro	1,5 cm	1,068	1,095	N	N	0,234	0,226
2	soro	2 cm	2,585	2,482	N	N	0,681	0,775
3	carboxi	2 cm	1,702	1,663	0,198	0,222	0,293	0,294
3	carboxi	1,5 cm	1,571	1,402	N	N	0,34	0,296
4	soro	2 cm	1,732	1,724	0,163	0,185	N	N
4	soro	1,5 cm	0,76	0,787	0,009	0,007	N	N
5	soro	2 cm	2,89	2,85	0,444	0,524	0,134	0,125
5	soro	1,5 cm	0,695	0,627	0,106	0,113	N	N
6	carboxi	2 cm	1,53	1,696	0,042	0,032	N	N
6	carboxi	1,5 cm	0,806	0,717	N	N	N	N
7	soro	2 cm	1,79	1,774	N	N	N	N
7	soro	1,5 cm	0,959	0,924	N	N	N	N
8	carboxi	2 cm	2,0116	2,215	0,333	0,304	N	N
8	carboxi	1,5 cm	0,718	0,718	0,174	0,154	N	N
9	soro	1,5 cm	1,116	1,103	N	N	N	N
9	soro	2 cm	1,604	1,597	0,5	0,5	N	N
11	soro	1,5 cm	1,027	1,01	0,004	0,004	N	N
11	soro	2 cm	1,36	1,307	0,111	0,101	N	N
12	carboxi	1,5 cm	0,711	0,738	0,029	0,022	N	N
12	carboxi	2 cm	1,891	1,927	0,037	0,034	N	N
13	carboxi	2 cm	2,077	1,965	0,076	0,069	0,377	0,335
13	carboxi	1,5 cm	0,89	0,784	0,099	0,112	N	N
14	soro	2 cm	0,963	1,049	0,019	0,011	N	N
14	soro	1,5 cm	2,012	2,017	0,448	0,472	N	N
16	soro	2 cm	3,407	3,376	N	N	0,796	0,749
16	soro	1,5 cm	1,221	1,129	N	N	N	N
17	carboxi	2 cm	2,841	3,023	N	N	0,656	0,59

APÊNDICE I – ÁREAS DO ENXERTO EM CM² CALCULADAS PELAS FOTOGRAFIAS COM O AUXÍLIO DO IMAGE J – FACE EXTERNA – CONTINUAÇÃO

FACE EXTERNA								
coelho	Grupo	Tamanho do enxerto	área total 1	área total 2	pega parcial 1	pega parcial 2	necrose total 1	necrose total 2
17	carboxi	1,5 cm	1,352	1,32	0,132	0,146	N	N
18	soro	2 cm	2,459	2,532	0,525	0,506	N	N
18	soro	1,5 cm	1,109	1,014	0,052	0,065	N	N
19	carboxi	2 cm	1,787	1,784	0,404	0,436	N	N
19	carboxi	1,5 cm	0,727	0,692	0,024	0,028	N	N
20	soro	2 cm	2,629	2,874	0,2	0,202	0,673	0,637
20	soro	1,5 cm	1,124	1,095	0,062	0,057	N	N

APÊNDICE J – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

DECLARAÇÃO

Declaro não apresentar nenhum conflito de interesse e não ter recebido recurso financeiro de empresas.

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de maio de 2010

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**EVOLUÇÃO DOS ENXERTOS COMPOSTOS DE CARTILAGEM SUBMETIDOS A CARBOXITERAPIA EM COELHOS.**”, UnBDOC nº 67.287/2009, sob responsabilidade do Prof. Dr. João Batista de Sousa, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA