

VICTOR ARAUJO FELZEMBURGH

**Pericárdio bovino descelularizado no
tratamento de queimadura**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

VICTOR ARAUJO FELZEMBURGH

**PERICÁRDIO BOVINO DESCELULARIZADO NO
TRATAMENTO DE QUEIMADURA**

Salvador
2018

VICTOR ARAUJO FELZEMBURGH

**PERICÁRDIO BOVINO DESCELULARIZADO NO
TRATAMENTO DE QUEIMADURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa
Coorientador: Prof. Dr. José Valber Lima Menezes

Salvador
2018

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Felzemburgh, Victor Araujo

Pericárdio bovino descelularizado no tratamento de queimadura./
[Manuscrito]. Victor Araujo Felzemburgh. Salvador, 2018.
67f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Coorientador: Prof. Dr. José Valber Lima Menezes.

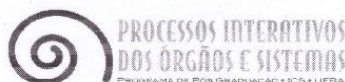
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos Dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2018.

1. Queimadura. 2. Ferimentos e Lesões. 3. Ratos 4. Pericárdio
5. Colágeno. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Menezes, José Valber Lima.
III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa
de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.
IV. Título

CDD – 617.11 21. ed.

FOLHA DE APROVAÇÃO – DISSERTAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO

VICTOR ARAÚJO FELZEMBURGH

Tratamento de Queimadura com Pericárdio Bovino Descelularizado

Salvador, Bahia, 23 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa – Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a Lydia Masako Ferreira – Universidade Federal do Estado de São Paulo

Prof. Dr. Mario Castro Carreiro – Universidade Federal da Bahia

A Deus, por iluminar o meu caminho.

A meus pais, que tanto amo e que são meu exemplo de força, coragem e luta.

A minha avó e meus irmãos, que sempre estão a meu lado, apoiando e
incentivando.

A minha querida Ana Vitória, pelo companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia, pela excelente orientação, pela preocupação e pelo cuidado.

Ao Prof. Dr. José Valber Lima Menezes, Professor titular de Cirurgia Plástica do Departamento de Anestesiologia e Cirurgia (DAC) do HUPES, FAMEB, UFBA, um exemplo a ser seguido como profissional dedicado à profissão e ao ensino, pela orientação nas pesquisas e na vida.

Ao Prof. Dr. José Humberto de Oliveira Campos, Professor Titular de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental I da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, um exemplo a ser seguido como profissional dedicado à profissão e ao ensino, pela orientação nas pesquisas e na vida.

À Profa Dra. Maria das Graças Farias Pinto, do Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinária, pela dedicação aos animais.

Ao Prof Dr. Mario Castro Carreiro, Coodenador do Núcleo de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (NUPE), pela disponibilidade e atenção, e aos demais Professores Permanentes do NUPE, Prof. Dr. Edirioamar Peixoto Matos, Prof. Dr. Mário César Abreu, Prof. Dr. Normand Araújo Moura, Prof. Dr. Pedro Hamilton Guimarães e Prof. Dr. Marcus Antônio de Mello Borba, pelo momentos de aprendizagem e conhecimento.

À Sra. Rutinea Costa Barbosa, secretária do NUPE, pela atenção e pelo cuidado com o NUPE e com os animais desse núcleo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior, Patologista do Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), pela gentileza ao analisar os espécimes.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB),

por compartilhar conhecimentos, dificuldades e alegrias.

À Braille Biomédica (Av. Pres. Juscelino K. de Oliveira, 1505 - Tarraf I, São José do Rio Preto), por disponibilizar o biomaterial para desenvolver pesquisa e inovação.

Ao IPAC, Instituto de Patologia Geral e Cutânea (Av. Anita Garibaldi, 1815 - Ondina, Salvador), por contribuir na confecção das lâminas e na análise histomorfométrica.

Ao Instituto de Ciências da Bahia da Universidade Federal da Bahia, ICS UFBA, por abrigar o LBTB e o Programa Ppg-PIOS.

À Faculdade de Medicina Universidade Federal da Bahia (FAMEB) por abrigar o NUPE e ser uma casa respeitada de ensino médico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Fapesb (R. Prof. Aristίδes Novis, 203 Federação, Salvador), por apoiar e financiar o pesquisador.

À Universidade Federal da Bahia UFBA (Rua Augusto Viana s/n Palácio da Reitoria, Canela, Salvador), pelo apoio institucional, fundamental à execução deste trabalho.

Aos alunos e pacientes, motivos de nosso estudo e de nosso aprimoramento.

À Dra. Esmeralda das Gracas Pontes Vilasboas Freitas, por abrir meus olhos e cuidar de mim nessa trajetória, lembrando a importância das pequenas coisas da vida, as quais, muitas vezes, não conseguimos enxergar.

FELZEMBURGH, Victor Araujo. **Pericárdio bovino descelularizado no tratamento de queimadura**. Salvador, 2018. 67f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. 2018.

RESUMO

Introdução – O tratamento do paciente queimado no tempo adequado evita ocorrência de sequelas. O uso de substitutos cutâneos à base de colágeno pode gerar uma ferida estéril e servir como arcabouço para que o processo de cicatrização ocorra. **Objetivo** – Avaliar o reparo tecidual após a aplicação do biomaterial de pericárdio bovino descelularizado para tratamento de queimadura cutânea. **Metodologia** – Trata-se de estudo de intervenção e pesquisa experimental, realizado com 48 ratos, distribuídos em dois grupos e submetidos a queimadura térmica no dorso pelo método com placa de latão. O grupo experimental recebeu tratamento após queimadura com biomaterial de pericárdio bovino descelularizado. O outro grupo recebeu tratamento com curativo de rayon embebido com petrolato. Os animais foram sacrificados e avaliados histomorfologicamente nos pontos biológicos nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias de pós-operatório. **Resultados** – Houve formação de tecido de granulação com fibras de colágeno posicionadas de forma mais paralela e com menos exsudato fibrino leucocitário no período inicial de tratamento no grupo experimental. Observou-se a manutenção da cobertura do tecido queimado com o biomaterial num período de até 28 dias. Ao fim de 60 dias, o grupo de controle apresentou uma maior contração tecidual média, quando comparado com o grupo experimental. **Conclusão** – O biomaterial de pericárdio bovino descelularizado foi biocompatível, promoveu a estabilidade da lesão e auxiliou no reparo da lesão cutânea por queimadura.

Palavras-chave: Queimaduras. Ferimentos e Lesões. Ratos. Pericárdio. Colágeno.

FELZEMBURGH, Victor Araujo. *Treatment of burn with decellularized bovine pericardium*. Salvador, 2018. 67f. yl. Thesis (Master's Degree in Interactive Processes of Organs and Systems) - Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador 2018.

ABSTRACT

Introduction - Treatment of the burned patient at the appropriate time prevents the occurrence of sequelae. The use of collagen-based skin substitutes can promote a sterile wound and serve as a framework for the healing process to occur. Objective - To evaluate tissue repair after the application of decellularized bovine pericardium biomaterial for the treatment of cutaneous burns. Methodology - This was an intervention study on experimental research with 48 rats, divided into two groups; with the experimental group being submitted to thermal burn on the back of the animals, by the brass plate method. After being burned, the experimental group received treatment with decellularized bovine pericardium biomaterial. The other group received treatment with rayon dressing soaked with petrolatum. The animals were sacrificed and evaluated histomorphologically at the biological time intervals of 7, 15, 28 and 60 postoperative days. Results - There was formation of granulation tissue with collagen fibers positioned in a more parallel manner and with less leukocyte fibrin exudate in the initial period of treatment in the experimental group. Maintenance of the biomaterial covering of the burned tissue was observed in up to 28 days. At the end of the 60 days, the control group presented a higher mean cicatricial contraction value when compared with that of the experimental group. Conclusion: The biomaterial was biocompatible, promoted the stability of the lesion and increased repair of the cutaneous lesion caused by the burn.

Keywords: Burns. Wounds and Injuries. Rats. Pericardium. Collagen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas do processamento dos tecidos. Tecidos ressecados do dorso com realização de cortes perpendiculares. Região central eleita para a realização da morfometria histológica. Demais regiões avaliadas de forma descritiva	24
Figura 2	Método de análise	26
Figura 3	Tratamento grupo experimental. 3A – Presença de biomaterial com pequenas alterações de arquitetura aos 15 dias. 3B – Presença de biomaterial com pequenas alterações de arquitetura aos 28 dias.	27
Figura 4	Tratamento grupo experimental, com 28 dias. Presença de biomaterial com alterações importantes na arquitetura.	28
Figura 5	Epiderme. A – Fotomicrografia do GE com 60 dias: tecido de granulação ainda em organização (seta verde) comparado com GC, imagem B , com tecido cicatricial mais denso e camada córnea da epiderme (seta cinza) bem formada. C – Tecido cicatricial do GC com 60 dias e, em D , área de tecido não queimado, mostrando anexos presentes na derme. E – tecido cicatricial com espessura da derme maior e presença de anexos (seta azul) cutâneos em permeio no GE aos 60 dias. F – Ausência anexos em região cicatricial. GE 023 GOLD 20X (60DIAS) GC 020 GOLD 20X (60DIAS) GE 020 GOLD 20X (60DIAS) GE 020 GOLD 20X (60DIAS)	32
Figura 6	Região de interface entre derme queimada e escarectomia. Apresenta lesão térmica em região de interface, em epiderme e derme subjacentes (seta amarela). Superfície apresenta lesão extensa, edema com proliferação vascular (seta vermelha), infiltrado de polimorfonucleares e presença de fibroblastos com deposição de colágeno (seta verde). Região mais superficial evidencia região de crosta (seta preta) e intensa presença de exsudato fibrino leucocitário (seta azul). GC001 - HE 5x	40
Figura 7	Região de contato: matriz de pericárdio descelularizada e derme (seta amarela). Reação inflamatória com fibroblastos abundantes e fibras colágeno, posicionada mais paralelamente que nos grupos de controle para esse mesmo período (seta verde). GE003 - HE 5x	40
Figura 8	Grupo Experimental com cobertura de biomaterial. O corte histológico mostra o biomaterial (amarelo) rico em colágeno e fibras elásticas recobrimdo a area queimada. GE 008 ORSEINA 7 DIAS 5X	41
Figura 9	Grupo experimental apresentando cobertura de biomaterial.(seta amarela) No período de 15 dias, não apresenta muita alteração em região de interface com o biomaterial. As regiões escuras espiraladas (laranja) indicam uma grande quantidade de fibra elástica nesse material em 15 dias. Percebe-se uma boa delimitação entre os planos. GE 001 ORSEINA 15 DIAS 5X	41
Figura 10	Presença de exsudato granulomatoso inflamatório no pós-operatório de 15 dias (seta preta). Localiza-se, principalmente, em região mais próxima da interface de borda e do contato com o tecido de queimadura, e mais distante da zona de interface do biomaterial (seta amarela). Imagem apresenta região de tecido de granulação (seta verde) próxima ao biomaterial com pouca reação, área de tecido subcutâneo (seta marrom) e tecido muscular (seta roxa). GE005 HE 5x	42

- Figura 11** Tecido de cicatrização central com 60 dias do GE (seta verde). 42
Mostra epiderme formada e ausência de biomaterial em interface (seta amarela). Mostra ainda anexos cutâneos e folículos (seta azul) em região próxima à cicatriz central. GE 019 20X ORSEINA 60DIAS
- Figura 12** Histomorfologia: corados com HE e aumento de 5x. No lado 43
esquerdo, apresenta lâminas do GE (A,C, E) e, à direita, lâminas referentes aos ratos GC (BDF), ordenados conforme o tempo de corte histológico 7 dias (AB), 15 dias (CD) 28 dias (EF). Imagens AB mostram contato de biomaterial e crosta em contato com tecido de granulação subjacente. A mostra grumo de bactérias mantidas externamente acima do biomaterial e pouca reação inflamatória com tecido com menos polimorfonucleares e organizados com menor intensidade. B apresenta exsudato fibrino leucocitário mais intenso sobre um tecido de granulação espesso e mais desorganizado. EF mostram área de cicatriz em lâmina de grupo de controle com epitelização da epiderme, e E apresenta área de epitelização abaixo do biomaterial, apresentando ainda áreas de tecido de granulação. GE003HE 5x GC001HE 5x GE005HE 5x GC009HE 5x GE018HE 5x GC004HE 5x
- Figura 13** Histomorfologia: corados com HE e aumento de 10x. No lado 44
esquerdo, apresenta lâminas do grupo experimental (A,C, E), e, à direita, lâminas referentes aos ratos do GC (BDF), ordenados conforme o tempo de corte histológico: 7 dias (AB), 15 dias (CD) e 28 dias (EF). Imagens evidenciam padrão de reticularização do tecido de granulação, sendo que o grupo experimental (AC) apresenta tecido de granulação menos exuberante, com menos edema e menos infiltrado inflamatório, revelando mais tecido fibroso e fibras de colágeno dispostas mais paralelamente para o mesmo período de pós-operatório (BD). No período de corte histológico com 28 dias, o grupo de controle (F) apresenta reepitelização da epiderme e uma cicatriz mais densa, quando comparado com o grupo do biomaterial (E). GE008HE 10x GC001HE 10x GE009HE 10x GC009HE 10x GE018HE 10x GC004HE 10x
- Figura 14** Composição de corte histológico da derme. A – Presença de 45
homogeneidade de coloração em porção central, compatível com processo cicatricial. Predomínio de fibrose (seta verde) e diminuição da espessura da derma para amostra do GC. B. Presença de cicatriz com tecido de granulação em maior extensão linear, no mesmo período de 60 dias (seta azul). C tecido com 28 dias mostra epiderme (seta cinza) formada e tecido de granulação.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Presença do biomaterial avaliando-se as fotografias. Grupo experimental	28
Gráfico 2	Avaliação clínica do tratamento nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias do GE e GC. As apresentações clínicas incluem lesão cruenta (ferida), lesão coberta com biomaterial e lesão de cicatriz.	28
Gráfico 3	Média da área da ferida ou da cicatriz do dorso do animal nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias	29
Gráfico 4	Média de comprimento em cm da ferida ou cicatriz nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias	30
Gráfico 5	Média de espessura da epiderme nos GC e GE dos tecidos cicatrizados em 28 e 60 dias	31
Gráfico 6	Média da área ocupada pelo tecido de granulação por campo na microscopia ótica. Foi padronizada a escolha do campo central para a avaliação	34
Gráfico 7	Média da extensão linear da lesão para os grupos GE e GC na avaliação histológica de cada animal	35
Gráfico 8	Avaliação da dispersão entre as variáveis de avaliação sem o uso de microscopia (comprimento e área da lesão) e a variável de extensão linear da lesão	36
Gráfico 9	Regressão para as variáveis extensão linear e área da lesão	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média da área da ferida ou da cicatriz do dorso do animal no momento dos pontos de corte biológico	29
Tabela 2	Cálculo da espessura média da região cicatricial da lesão. Incluídos apenas animais que apresentavam tecidos cicatrizados quando da inspeção clínica	31
Tabela 3	Medida da espessura do tecido de granulação e comparação de suas médias por grupo e por dias de pós-operatório	33
Tabela 4	Medida da extensão linear da lesão realizada em microscopia ótica. Cálculo das respectivas médias de acordo com o ponto de corte biológico aos 7,15, 28, e 60 dias do GE e GC	35
Tabela 5	Avaliação da correlação entre a área e o comprimento da lesão no dorso do animal, medidos nos pontos de corte biológico, e a extensão linear da lesão, calculada por microscopia	36
Tabela 6	Correlação entre área da lesão, calculada pelo ImageJ, e a extensão linear da lesão, calculada por microscopia	37
Tabela 7	Resumo do Modelo. Cálculo de R^2 e teste de Durbin-Watson	38
Tabela 8	Teste ANOVA para regressão linear simples entre a extensão linear e a área da extensão	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

FMB Faculdade de Medicina da Bahia

GC Grupo de controle

GE Grupo experimental

HE Hematoxilina-eosina

ICS Instituto de Ciências da Saúde

IPAC Instituto de Patologia Geral e Cutânea

LBTB Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais

NUPE Núcleo Universitário de Pesquisa Experimental

OR Orseína

PIFG Picrossirius red

TG Tricômico de Goldner

UFBA Universidade Federal da Bahia

µm Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	OBJETIVO GERAL	18
3	ARTIGO	19
4	INTRODUÇÃO	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	21
6	RESULTADOS	27
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO	53
	APÊNDICE	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

Anualmente, são feitos novos investimentos científicos e financeiros em biomateriais como substitutos cutâneos e coberturas cutâneas, existindo um número cada vez maior de produtos disponíveis no mercado. O estudo das propriedades de coberturas e substitutos cutâneos é importante para sua adequada seleção no reparo tecidual cutâneo. Define-se cobertura ou curativo como um meio terapêutico que consiste na limpeza e no uso de materiais visando à proteção, drenagem e absorção, a fim de melhorar as condições da ferida e promover o reparo.¹

O reparo tecidual para a cobertura de grandes ferimentos, em especial no paciente grande queimado, é complexo. A intervenção precoce e o fechamento das feridas implicam a melhora do prognóstico desses pacientes, com diminuição do tempo de internação hospitalar e menos sequelas.² Para isso, podem ser usados, como opção de fechamento, os enxertos cutâneos. Coberturas como curativos também podem ser usadas, além de uma gama de biomateriais, como substitutos da pele.

O melhor tratamento para a cobertura de uma queimadura deve ser feito com tecidos autólogos, como enxertos e retalhos. Entretanto, o paciente grande queimado, muitas vezes, não dispõe de área doadora de enxertos e retalhos para cobertura das feridas. Feridas provenientes de queimaduras devem, prioritariamente, ser tratadas em fase aguda.³ Mas não é incomum a presença de lesões crônicas e recidivantes devidas à falta de disponibilidade de tecido autólogo no início do tratamento.

O uso de enxerto de pele entre seres humanos é conhecido há milhares de anos, mas começou a ser descrito no final do século 19. Em 1869, Reverdin publicou notificação sobre a enxertia de pele de uma pessoa para outra. Em seguida, em 1881, Girdner descreveu o uso de enxerto de pele de cadáver em paciente grande queimado, com 75% de adesão.²

Devido à pouca disponibilidade de tecidos autólogos nos grandes queimados, o tecido alógeno ganhou amplo uso durante a Segunda Guerra Mundial e, a partir desse período, houve a criação de inúmeros bancos de pele.⁴ O enxerto de pele de cadáver (alógeno) apresenta características importantes para o tratamento do paciente grande queimado, como boa

aderência ao leito receptor, baixa toxicidade e antigenicidade, facilidade de aplicação e de remoção, redução da perda de água, eletrólitos e proteínas, além de um bom efeito antimicrobiano. Esse tipo de enxerto também diminui a dor.⁵

Apesar de o enxerto alógeno ser de grande utilidade, os bancos de pele no Brasil são poucos. Isso resulta na menor disponibilidade de tecidos para tratamento. Existem, ainda, outras questões sociológicas e comportamentais que envolvem o uso de doação de órgãos entre humanos, as quais, muitas vezes, não são discutidas adequadamente na sociedade.

Devido à pouca disponibilidade do tecido autólogo para esses tratamentos, outros recursos devem ser utilizados.^{4,5} É nesse cenário que o uso de matrizes acelulares e outros substitutos dérmicos têm uma participação imprescindível no tratamento de extensas áreas em grandes queimaduras. Esses substitutos cutâneos podem ser usados como primeira escolha ou de forma adjuvante, como substitutos temporários.

Os biomateriais são utilizados rotineiramente em aplicações médicas, como distribuição de drogas, engenharia de tecidos, dispositivos para terapias e contrastes em diagnósticos por imagens. Tem sido reconhecido que as propriedades dos biomateriais afetam os resultados biológicos e podem ter impacto profundo na proliferação das células e no remodelamento dos tecidos.^{6, 7}

Feridas e queimaduras são problemas constantes que envolvem alto custo.⁸ Nos Estados Unidos, cerca de 6,5 milhões de pacientes com feridas crônicas e 1,25 milhões de queimados são tratados por ano.^{8, 9}

No processo de reticulização do pericárdio bovino, o uso do glutaraldeído é um aliado importante, pois auxilia no controle do tempo de permanência desse substituto na área aplicada. Apresenta também propriedades de biocompatibilidade e menos toxicidade.¹⁰

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o reparo tecidual após a aplicação do biomaterial de pericárdio bovino descelularizado para tratamento de queimadura cutânea.

3 ARTIGO

Tratamento de queimadura com pericárdio bovino descélularizado

Burn treatment with decellularized bovine pericardium

Victor Araujo Felzemburgh¹, Aryon de Almeida Barbosa Júnior², José Valber Lima Menezes³, Fabiana Paim Rosa⁴

Resumo

O tratamento do paciente queimado no tempo adequado evita a ocorrência de sequelas. O uso de substitutos cutâneos à base de colágeno pode promover uma ferida estéril e servir como arcabouço para que o processo de cicatrização ocorra corretamente. Objetivo – Avaliar o reparo tecidual após aplicação do biomaterial de pericárdio bovino descélularizado para tratamento de queimadura cutânea. Metodologia – Trata-se de estudo de intervenção e pesquisa experimental com 48 ratos, distribuídos em dois grupos e submetidos a queimadura térmica no dorso pelo método com placa de latão. O grupo experimental recebeu tratamento após queimadura com biomaterial de pericárdio bovino descélularizado. O outro grupo recebeu tratamento com curativo de rayon embebido com petrolato. Os animais foram sacrificados e avaliados histomorfologicamente nos pontos biológicos nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias de pós operatório. Resultados – Houve formação de tecido de granulação com fibras de colágeno posicionadas de forma mais paralela e com menos exsudado fibrino leucocitário no período inicial de tratamento. Observou-se a manutenção da cobertura do tecido queimado com o biomaterial em até 28 dias. Ao fim de 60 dias, o grupo de controle apresentou uma maior contração tecidual média quando comparado com o grupo experimental. Conclusão – O biomaterial de pericárdio bovino descélularizado foi biocompatível, promoveu a estabilidade da lesão e auxiliou no reparo da lesão cutânea por queimadura.

Palavras-chave: Queimaduras. Ferimentos e Lesões. Ratos. Pericárdio. Colágeno.

Abstract

Introduction - Treatment of the burned patient at the appropriate time prevents the occurrence of sequelae. The use of collagen-based skin substitutes can promote a sterile wound and serve as a framework for the healing process to occur. Objective - To evaluate tissue repair after the application of decellularized bovine pericardium biomaterial for the treatment of cutaneous burns. Methodology - This was an intervention study on experimental research with 48 rats, divided into two groups; with the experimental group being submitted to thermal burn on the back of the animals, by the brass plate method. After being burned, the experimental group received treatment with decellularized bovine pericardium biomaterial. The other group received treatment with rayon dressing soaked with petrolatum. The animals were sacrificed and evaluated histomorphologically at the biological time intervals of 7, 15, 28 and 60 postoperative days. Results - There was formation of granulation tissue with collagen fibers positioned in a more parallel manner and with less leukocyte fibrin exudate in the initial period of treatment in the experimental group. Maintenance of the biomaterial covering of the burned tissue was observed in up to 28 days. At the end of the 60 days, the control group presented a higher mean cicatricial contraction value when compared with that of the experimental group. Conclusion: The biomaterial was biocompatible, promoted the stability of the lesion and increased repair of the cutaneous lesion caused by the burn.

Keywords: Burns. Wounds and Injuries. Rats. Pericardium. Collagen.

Correspondente/Corresponding: *Victor Araujo Felzemburgh. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia - Endereço: Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela - 40.110-902, Salvador, Bahia. Tel.: (71) 3283-8943. E-mail: victor.doc@hotmail.com

¹ Mestrando em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

² Patologista, Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC).

³ Professor Titular de Cirurgia Plástica, UFBA.

⁴ PhD. Professora Adjunta de Patologia do instituto de Ciências da Saúde-UFBA.

4 INTRODUÇÃO

O pericárdio bovino provém de frigorífico, sendo de fácil disponibilidade. Se for previamente tratado com glutaraldeído e descelularizado, pode ser amplamente utilizado no tratamento de hérnias e eventrações da parede abdominal, assim como pode funcionar como substituto para dura-máter, uretroplastias, correção de defeitos torácicos e tratamento de aneurisma de aorta e cirurgias cardíacas.¹⁰

O paciente grande queimado apresenta uma perda de pele em uma porcentagem de superfície corpórea importante. A pele tem função de cobertura, com propriedades fisiológicas próprias imprescindíveis, e mantém assegurada a proteção do organismo em relação ao meio externo. Feridas e queimaduras são problemas constantes que envolvem alto custo.⁸

A bioengenharia tecidual tem emergido como uma abordagem promissora no reparo e regeneração de tecidos e órgãos funcionalmente comprometidos.^{11,12} Esse campo de pesquisa relativamente recente integra diversas áreas do conhecimento, como a ciência dos materiais, as engenharias e a biologia, com o objetivo de desenvolver e (ou) aperfeiçoar as técnicas e os biomateriais que contribuam para o restabelecimento da função.¹³

Este estudo procura avaliar o reparo tecidual após a aplicação do biomaterial de pericárdio bovino descelularizado para tratamento de queimadura cutânea.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de intervenção com pesquisa experimental em animais. O número total dos animais foi distribuído em dois grupos (grupo de controle e grupo experimental), sendo submetidos a queimadura térmica no dorso pelo método com placa de latão. O grupo experimental recebeu tratamento, após queimadura com biomaterial de pericárdio bovino descelularizado. O outro grupo recebeu tratamento com curativo de rayon embebido com petrolato. Ambos foram avaliados quanto ao reparo das lesões. Os animais foram avaliados por um período de até 60 dias.

Todos procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciência da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob o protocolo número 115/2017.

AMOSTRA

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, entre 10 e 14 semanas de idade, pesando entre 200 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Veterinária e operados no Núcleo Universitário de Pesquisa Experimental (NUPE), na Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Foram alocados 24 animais no grupo experimental (GE) e 24 no grupo controle (GC). Todos foram operados e avaliados nos períodos de ponto de processamento histológico de 7, 15, 28 e 60 dias do pós-operatório.

INFORMAÇÕES SOBRE O BIOMATERIAL

O pericárdio bovino utilizado no estudo foi proveniente da Braille Biomédica (São José Rio Preto, SP). A obtenção do pericárdio bovino (PB) ocorre em frigorífico, de forma imediata ao abate do animal previamente examinado pelo Serviço de Inspeção Federal e com até 60 meses de idade. O material segue para um processo de remoção de gorduras e posterior

armazenamento em soluções de cloretos de sódio e magnésio tamponado com pH 7,4. Em seguida, é tratado com soluções de agentes quelante e surfactante neutro e aniônico, padronizados pela empresa, e mantido em solução de pH > 12, para diminuição do risco da encefalopatia espongiforme bovina, sendo preservado em etanol 70%.

A empresa realizou, previamente ao fornecimento do biomaterial, testes para confirmação da descelularização. A micrografia de microscopia ótica evidencia a eficácia do processo de descelularização, ao mostrar completa ausência de células no PB processado, quando comparado ao PB nativo. As micrografias mostram ainda que o ordenamento natural das fibras colagênicas é preservado, havendo apenas aumento do espaço entre elas, também mostrado pelas micrografias de microscopia eletrônica de varredura.

AMBIENTE E PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os animais foram mantidos no biotério do NUPE da FMB, em gaiolas metálicas, com umidade entre 45 e 50% e temperatura média de 22° C, sem exposição direta à iluminação solar e a ruídos, alimentados com ração padrão peletizada duas vezes ao dia, associada à suplementação hídrica apropriada. Cada gaiola com 1500 cm² conteve 6 animais até o dia do procedimento cirúrgico e, em seguida, foi alocado 1 animal por gaiola.

A anestesia foi realizada com cloridrato de cetamina 75mg/kg, associado a cloridrato de xilazina 5 mg/kg, por via intraperitoneal, conforme técnica preconizada por Damy.¹⁵

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O animal anestesiado foi posicionado em decúbito ventral em mesa operatória adequada para ratos, sendo feita tricotomia em todo o dorso e na região de coxas, poupando-se a porção ventral, membros e cabeça. Em seguida, foi feita a antisepsia com polivinilpirrolidona-iodo 1%.

A queimadura foi realizada por meio de uma barra de latão que media 5,5 x 2,0 x 2,0 cm, aquecida em água fervente, de modo que a temperatura chegasse a 100° C, medida com auxílio de um termômetro. A barra foi mantida em contato com a pele tricotomizada do animal por 20 segundos, produzindo

queimaduras de terceiro grau, com base em modelo experimental descrito por Meyer e Silva.¹⁶

Todos os 48 animais foram submetidos a queimadura conforme protocolo da pesquisa. O dorso de cada animal do grupo experimental recebeu tratamento com pericárdio bovino descelularizado e, em cada animal do grupo de controle, foi aplicado o rayon com petrolato. A fixação foi feita com sutura contínua com Nylon 5,0 e curativo de Brown com gaze simples foi realizado sobre o tratamento. Todos os animais receberam curativo secundário com esparadrapo para estabilizar o curativo do dorso. A analgesia foi feita em todos animais com acetaminofenol (paracetamol) 200mg/kg, conforme Damy.¹⁵

Após enxertia, os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação e acompanhamento.

COLETA DE AMOSTRAS E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Para o sacrifício, o pentobarbital foi administrado por via intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg¹⁵. Seis animais foram sacrificados em cada ponto biológico: 7, 15, 28 e 60 dias do pós-operatório, sendo retirados os tecidos do dorso após anestesia, antes do sacrifício.

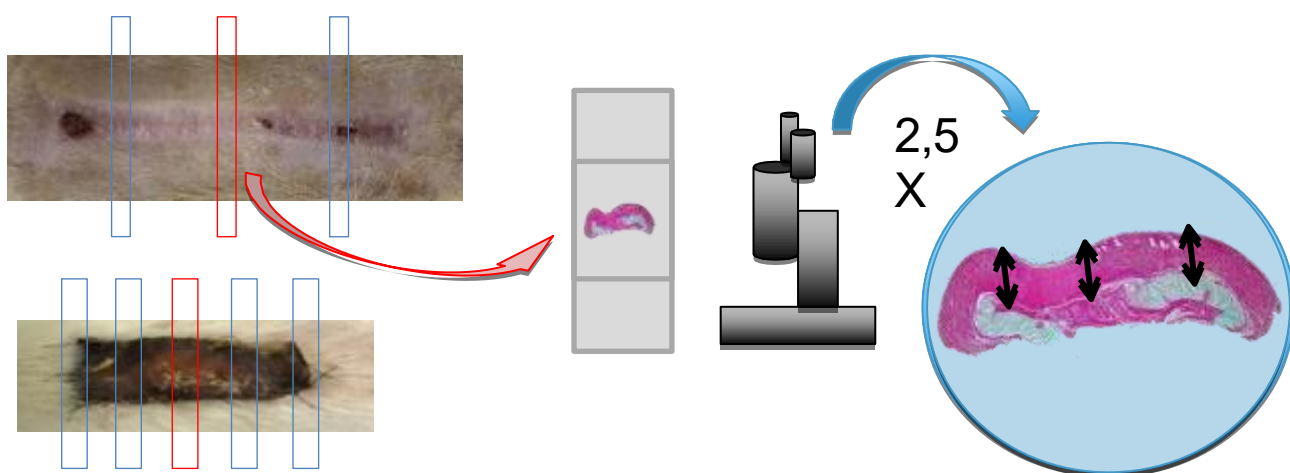
Na data prevista para o sacrifício, todos os animais foram fotografados (Sony alfa 5000, 55 mm), e as imagens foram avaliadas pelo programa ImageJ.^{17, 18} Para a escarectomia, as amostras foram retiradas do dorso, após protocolo anestésico prévio e foi realizada ressecção com margem de 0,5 cm da borda da lesão cruenta ou cicatriz e profundidade abaixo do plano muscular, incluindo o músculo *panniculus carnosus*. Essas amostras foram fixadas em solução de formol tamponada a 4%. Após fixadas por 48 horas, as amostras do grupo experimental foram cortadas em 5 regiões para se avaliar a região de interface do biomaterial, em região central, media central anterior e posterior e região de interferência da borda anterior e posterior. Nas amostras do grupo de controle, foi realizado corte em 3 regiões, não sendo realizada avaliação da região de interface de borda anterior e posterior pela ausência do biomaterial. As amostras foram processadas, emblocadas individualmente em parafina e cortadas com 5 micrômetros (µm) de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), orseína (OR), *picrossirius* red (PIFG) e Tricômico de Goldner (TG). As lâminas foram examinadas por microscopia de luz no

microscópio LEICA DM6B e fotografadas com câmera DFC 700T, programa LAS V.4.12 Leica ApplicationSuit. Para a realização da análise morfológica, foi utilizado microscópio de luz comum (DM1000, Leica®, Wetzlar, Germany), com câmera digital DFC 310 FX (Leica®, Wetzlar, Germany). Para as medições, foi utilizado o programa QWIN Plus V3.5.1 Leica Microsystem (Switzerland) Ltd.

Foram medidas em μm a espessura do tecido de granulação, a espessura total da lesão e a espessura da cobertura da lesão (biomaterial ou crosta). Foram realizadas ainda as medidas da área do tecido de granulação, da cobertura da lesão e da cicatriz (nos períodos mais tardios), além da medida da extensão linear da ferida ou da cicatriz, de acordo com o tempo de pós-operatório, e com a apresentação clínica da lesão no momento da ressecção.

Para a realização das medições, utilizou-se lâmina para corte histológico da área central da lesão. Para se determinar a espessura, foi utilizada a objetiva de 2,5x e, para a mensuração dessa variável, foram realizadas três medidas em regiões diferentes de cada corte e calculados a média e o desvio padrão. Para o cálculo da área da lesão, foi determinado um aumento de 2,5x e o campo mais central da lâmina para medição. O cálculo da extensão linear da ferida ou cicatriz foi feito com aumento de 2,5x. Para se determinar a espessura da epiderme, foi usado um aumento de 20 vezes (Figura 1).

Figura 1 – Etapas do processamento dos tecidos. Tecidos ressecados do dorso com realização de cortes perpendiculares. Região central eleita para a realização da morfometria histológica. Demais regiões avaliadas de forma descritiva



Fonte: Autoria própria

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a tabulação e a análise dos dados, foi utilizado programa *Satistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 12.0. A análise e a descrição foram expressas, para as variáveis contínuas, por média e desvio padrão; quando por distribuição normal, por mediana e intervalo interquartil; por distribuição não normal e por proporções para variáveis qualitativas.

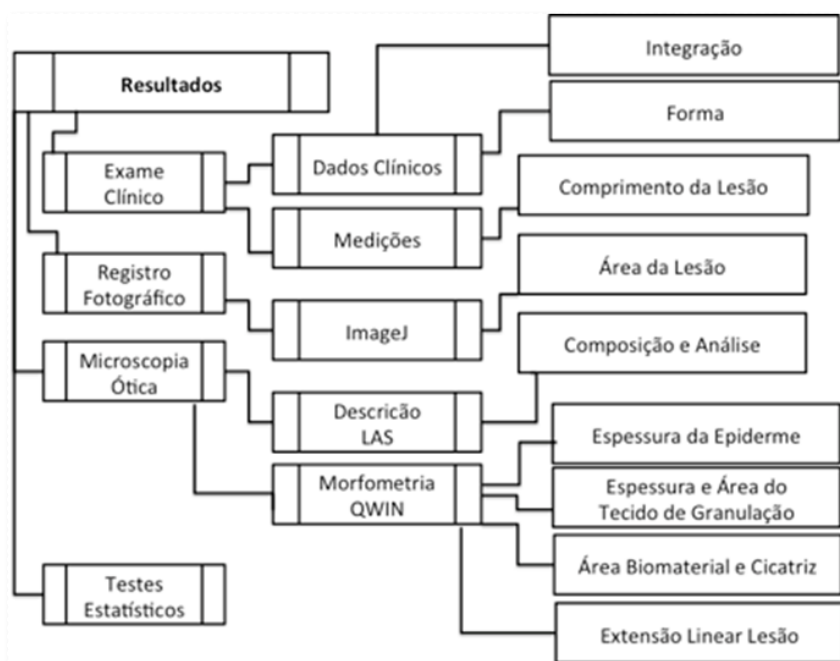
Para a análise dos dados quantitativos, foi feita a opção por análise de test T independente para variáveis pareadas, após verificação por teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk; o Teste de Levene foi utilizado para verificar igualdade de variâncias e homogeneidade dos dados obtidos pela microscopia e dados da obtidos pelas fotografias e medições (macroscopia).

Foi avaliada a correlação das variáveis pelo coeficiente de correlação de Pearson para variáveis paramétricas e de Spearman para as não paramétricas; para os grupos de controle e experimental, avaliou-se a correlação dos dados da macroscopia (área da lesão e comprimento da lesão) e da microscopia (extensão linear da lesão).

Após realizar efetivada a correlação, foi realizada uma regressão linear simples para avaliar se uma variável da macroscopia poderia prever uma outra (microscopia). Para isso, foi checada a independência dos valores e resíduos, a relação linear entre as variáveis, a normalidade e a independência dos resíduos (uso do teste de Durbin-Watson admitido para este estudo entre 1 e 3) e a homocedasticidade.

Os métodos da análise dos dados e de produção dos resultados são apresentados na Figura 2.

Figura 2 – Método de análise



Fonte: Autoria própria

6 RESULTADOS

Não houve óbito no pós-operatório de nenhum dos 48 animais.

ANÁLISE MACROSCÓPICA

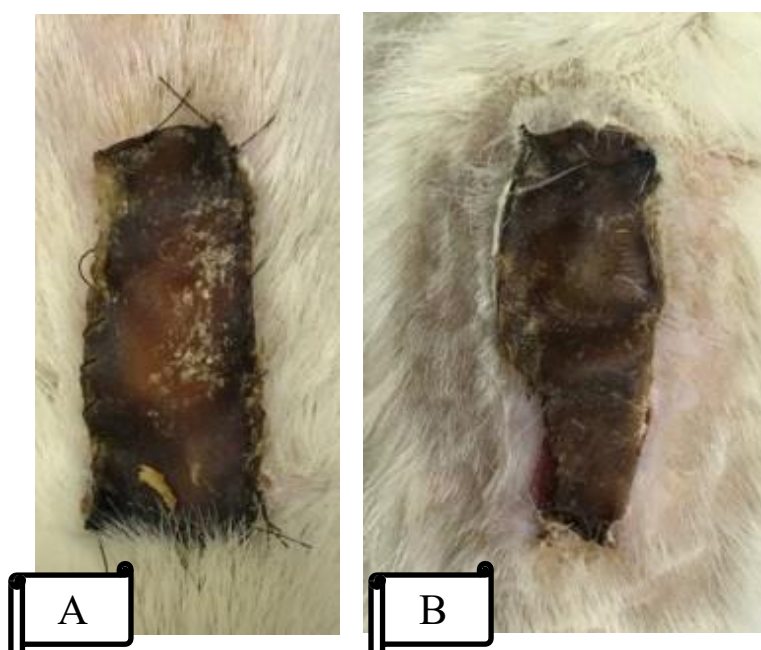
A lesão inicial por queimadura foi confeccionada do tamanho do biomaterial – 5,5 cm por 2,0 cm –, sendo essa a área inicial da lesão (11 cm²).

Em todos animais, observou-se diminuição dessa área inicial no decorrer do pós-operatório, alguns mantendo a arquitetura retangular inicial, outros perdendo esse formato.

Para o primeiro grupo de 24 animais (GE), foi observada, na macroscopia, uma boa adesão superficial do biomaterial à ferida. O biomaterial estava presente para os grupos experimentais (GE) até 28 dias.

O biomaterial manteve seu formato retangular estável no decorrer do período pós-operatório. Nos 7 dias, não houve registro (0%) de alteração da arquitetura do biomaterial. Com 15 dias, 33% dos animais apresentavam alteração da arquitetura. 100% dos animais apresentaram algum tipo de alteração no formato no período de 28 e 60 dias (Figura 3).

Figura 3 – Tratamento grupo experimental. 3A – Presença de biomaterial com pequenas alterações de arquitetura aos 15 dias. 3B – Presença de biomaterial com pequenas alterações de arquitetura aos 28 dias.



Fonte: Autoria própria

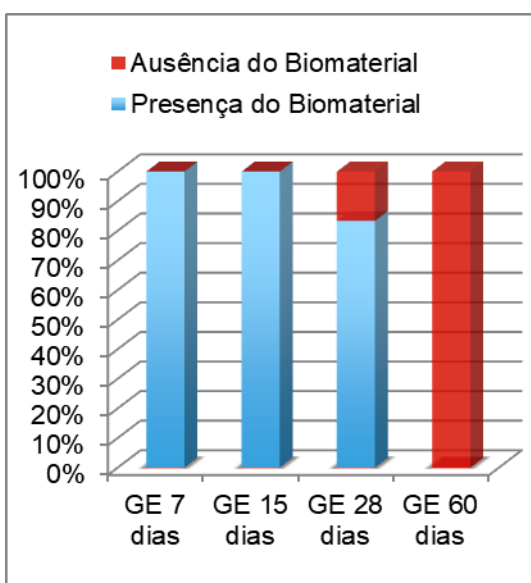
As fotografias mostraram que, até 28 dias, 88,9% dos animais não apresentavam alteração importante (maior que 10% da área total do biomaterial). Dois animais do grupo de 28 dias mostraram alterações importantes (Figura 4). No período da eutanásia, com 60 dias, não foram encontrados biomateriais sobre o local da cicatrização da ferida (Gráfico 1). Não foi verificada a existência de ferida cruenta nos animais do GC com 28 e 60 dias, e GE com 60 dias (Gráfico 2).

Figura 4 - Tratamento grupo experimental com 28 dias. Presença de biomaterial com alterações importantes na arquitetura.



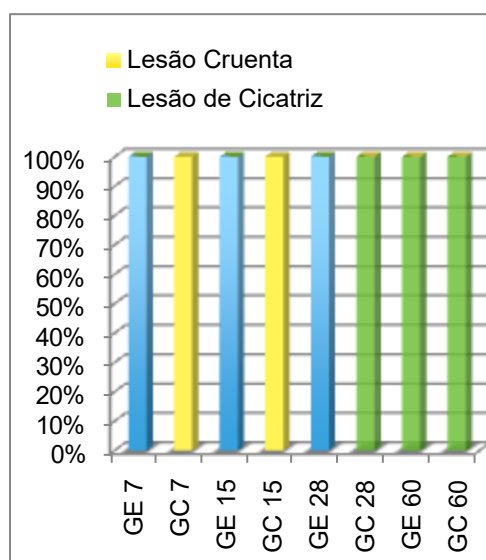
Fonte: Autoria própria

Gráfico 1 – Presença do biomaterial, avaliando-se as fotografias. Grupo experimental



Fonte: Dados da pesquisa

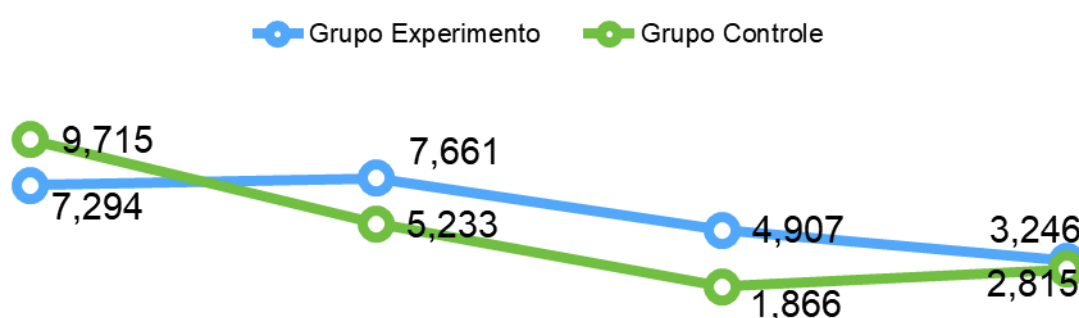
Gráfico 2 – Avaliação clínica do tratamento nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias do GE e do GC. As apresentações clínicas incluem lesão cruenta (ferida), lesão coberta com biomaterial e lesão de cicatriz.



Fonte: Dados da pesquisa

Houve variação no tamanho da área de escarectomia após a queimadura, mas todas as áreas mantiveram o formato retangular inicial. No decorrer dos dias após a queimadura, houve alteração do formato inicial, com outras variações poligonais. Para a medição da área da ferida cruenta em tratamento ou da cicatriz (mas tardiamente), foi utilizado o programa imageJ. Com a medição da lesão ou cicatriz a partir dos pixels, em cm, foi observada uma área média entre os grupos que variou de 9.715 cm² a 1.866 cm² (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Média da área da ferida ou da cicatriz do dorso do animal nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias



Fonte: Dados da pesquisa

Os valores de área calculados pelo programa ImageJ, obtidos pelas fotografias nos dias da eutanásia dos animais, mostraram que a média da área do GE (5776,9583) foi maior que a do GC (3480,3500) (Tabela 1). O resultado apresentou significância para o teste t independente $t(42) = 3,466; p = 0,001$.

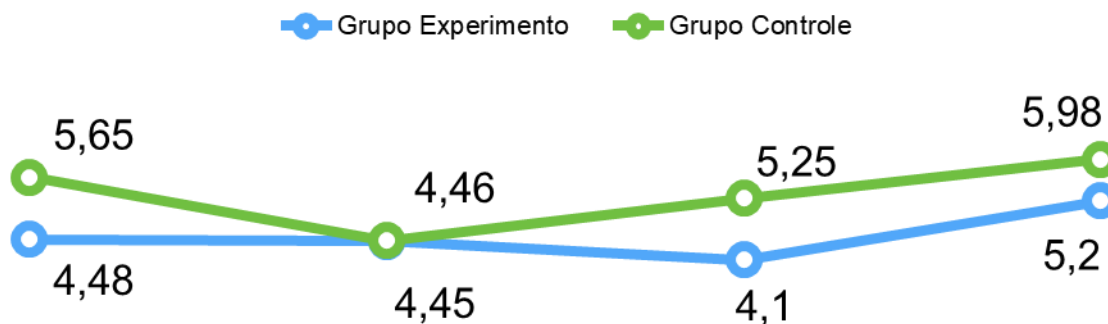
Tabela 1 – Média da área da ferida ou da cicatriz do dorso do animal no momento dos pontos de corte biológico

	N	Grupo experimental	N	Grupo de controle
7 dias	6	7294	6	9715
15 dias	6	7661	6	5233
28 dias	6	4907	6	1866
60 dias	6	3246	6	2815
Média	24	5776,9583	24	3480,3500

Fonte: Dados da pesquisa

Houve um aumento no comprimento (no maior sentido do ferimento ou cicatriz) no eixo paralelo à coluna dorsal do animal. Observou-se um aumento da média desse comprimento com o decorrer do pós-operatório. A média do grupo experimental aumentou de 4,48 para 5,2, e a do grupo de controle manteve valores maiores, com um aumento de 5,65 para 5,98 (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Média de comprimento em cm da ferida ou cicatriz, nos períodos de 7, 15, 28 e 60 dias



Fonte: Dados da pesquisa

Análise histomorfológica

Análise da epiderme

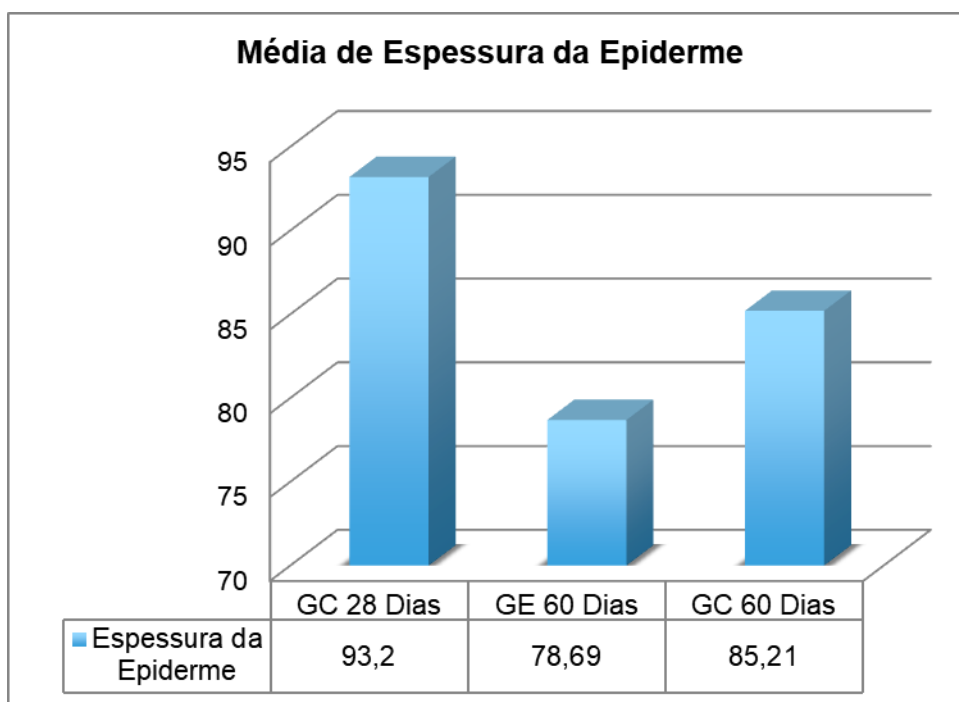
O grupo GE, aos 28 dias, ainda apresentava tecido cruento sem a reepitelização completa, não sendo possível medir a espessura da derme cicatrizada. Diferentemente do GC aos 28 e do GE e GC aos 60 dias, que apresentavam lesão cicatricial com presença de epiderme cicatrizada.

A medida da espessura da epiderme da região da cicatriz em μm foi menor para o GE que para o GC com 60 dias.

A espessura média da epiderme do GE, aos 60 dias, representou 2,76% da espessura total média da pele normal, e a do GC, 2,94%. A média da espessura do tecido normal dos dois grupos foi semelhante com 60 dias – de 2898 e 2849. A proporção do GE aos 60 dias, de 2,76%, foi diferente do GC aos 28 dias (3,47%)

A comparação da média da espessura da epiderme do GE (78,6983) e do GC (85,2167), no período de 60 dias, não mostrou significância. $t(10)=-518$; $p=0,616$. A comparação do GE em 60 dias e GC de 28 dias (93,2050) também não mostrou significância ao teste T independente. (Figura 5 e Tabela 2): $t(10)=-1,329$; $p=0,213$

Gráfico 5 – Média de espessura da epiderme nos GC e GE dos tecidos cicatrizados em 28 e 60 dias



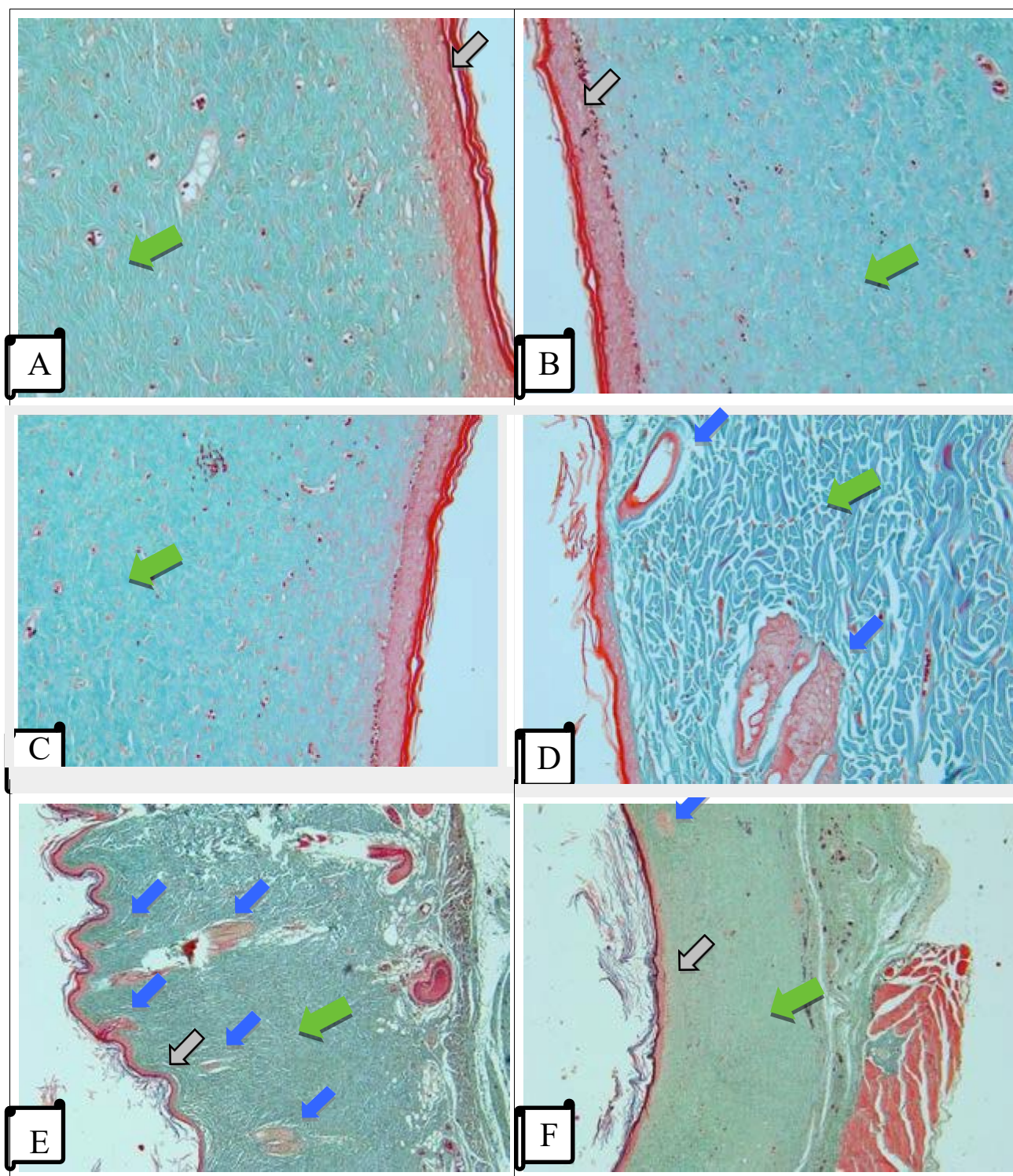
Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 – Cálculo da espessura média da região cicatricial da lesão. Incluídos apenas animais que apresentavam tecidos cicatrizados quando da inspeção clínica

Medições	Esquerda	Centro	Direita	Média	DP-δ
RC004	92,19	81,8	89,44	87,81	5,38
RC006	103,46	84,17	99,18	95,60333333	10,1301744
RC007	80,12	102,16	159,61	113,9633333	41,0384458
RC008	88,99	74,8	98,72	87,50333333	12,02909944
RC010	66,08	74,64	70,74	70,48666667	4,285619364
RC012	104,92	119,17	87,4	103,83	15,91302297
Total GC 28 dias				93,2050	
RE014	77,49	81,63	62,12	73,75	10,28
RE017	130,66	122,04	107,53	120,0766667	11,68932134
RE019	90,24	69,02	54,96	71,40666667	17,76067942
RE020	84,81	45	50,07	59,96	21,66952007
RE021	78,15	107,48	56,68	80,77	25,50114311
RE023	52,96	62,89	65,71	60,52	6,697260634
Total GE 60 dias				78,6983	
RC015	98,7	134,38	117,89	116,99	17,86
RC016	74,55	82,39	107,17	88,03666667	17,02732314
RC018	73,55	74,64	76,64	74,94333333	1,567173677
RC020	101,02	89,17	98,46	96,21666667	6,23538558
RC021	52,33	48,52	48,51	49,78666667	2,202596952
RC024	58,96	86,36	102	82,44	21,78612402
Total GC 60 dias				85,2167	

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 – Epiderme. **A** – Fotomicrografia do GE com 60 dias: tecido de granulação ainda em organização (seta verde) comparado com GC, imagem **B**, com tecido cicatricial mais denso e camada córnea da epiderme (seta cinza) bem formada. **C** – Tecido cicatricial do GC com 60 dias e, em **D**, área de tecido não queimado, mostrando anexos presentes na derme. **E** – tecido cicatricial com espessura da derme maior e presença de anexos (seta azul) cutâneos em permeio no GE aos 60 dias. **F** – Ausência anexos em região cicatricial. GE 023 GOLD 20X (60DIAS) GC 020 GOLD 20X (60DIAS) GE 020 GOLD 20X (60DIAS) GE 020 GOLD 20X (60DIAS)



Fonte: Elaborada pelo autor
Avaliação do tecido de granulação 7 e 15 dias
Espessura do Tecido de granulação 7 e 15 dias

O cálculo do tecido de granulação no GE teve como referência a interface do biomaterial com a camada muscular ou fáscia subjacente. No GC, o parâmetro foi abaixo da presença do exsudato fibrino granular e da crosta presentes na lesão do animal. Foi observado que a área muscular no grupo de controle é menos visível do que no grupo experimental.

O teste-t independente mostrou que, em média, o grupo experimental apresenta tecido de granulação com menor espessura do que o do grupo de controle, quando comparados, juntos, em 7 e 15 dias: $t(22) = -4,116$; $p < 0,001$. O valor médio do grupo experimento foi de 486,1936 e o do grupo de controle, 1267,6350. Esses dados também apresentaram significância quando avaliados no período de 7 e 15 dias, individualmente.

Medida a espessura em μm do tecido de granulação, constatou-se, no grupo experimental e no de controle, aos 7 dias, um valor médio de 387,1350 e 929,1350 e, aos 15 dias, 585,0944 e 1606,1350 (Tabela 3).

Tabela 3 – Medida da espessura do tecido de granulação e comparação de suas médias por grupo e dias de pós-operatório

	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Espessura do tecido de granulação	GE 7	6	387,2928 22,2%*	457,6951	186,8532
Relação espessura total*	GC 7	6	929,1350 55,9%*	382,16800	156,01943
Espessura do tecido de granulação	GE 15	6	585,0944 31,27%*	457,69512	186,85325
Relação espessura total*	GC 15	6	1606,1350 85,87%*	439,22521	179,31294

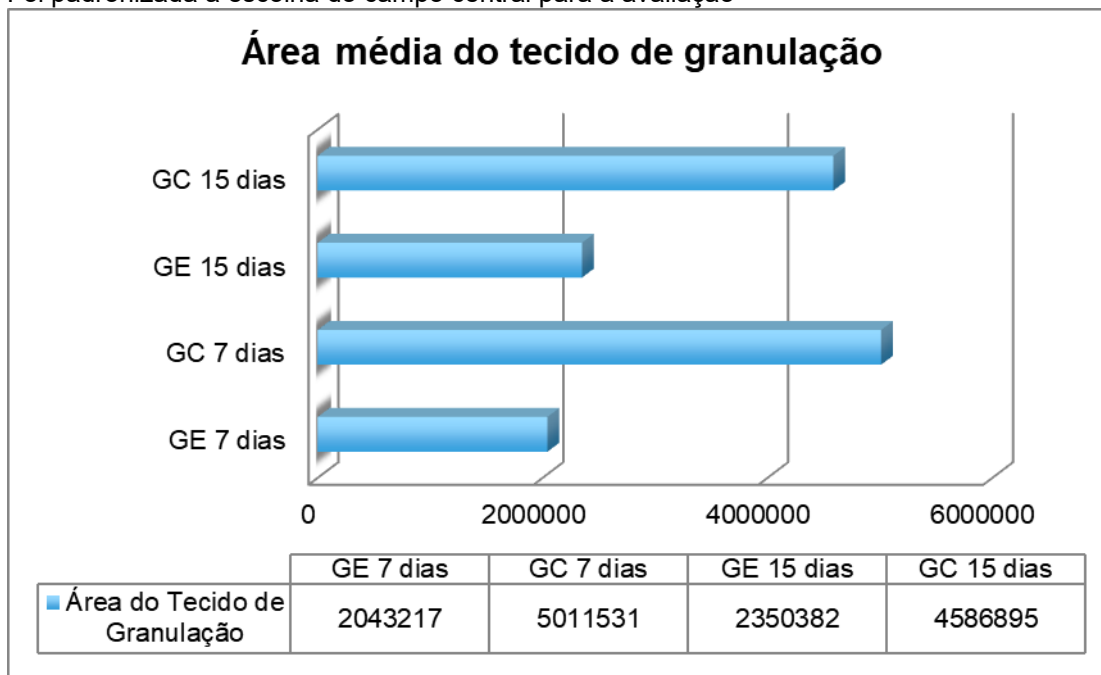
*Relação em porcentagem entre a média da espessura que o tecido de granulação ocupa na lâmina e a respectiva média da espessura total da derme estudada.

Fonte: Dados da pesquisa

O campo central da lâmina foi utilizado para medir a área do tecido de granulação. Foi observado que a média da área do tecido de granulação visualizado por campo no GE foi menor (2196799,5708) do que no GC

(4743718,8750), nos períodos de 7 e 15 dias (Gráfico 6). $t(22) = -3,761$; $p=0,001$.

Gráfico 6 – Média da área ocupada pelo tecido de granulação por campo na microscopia ótica. Foi padronizada a escolha do campo central para a avaliação



Fonte: Dados da pesquisa

ÁREA DO BIOMATERIAL

A média da área do biomaterial se manteve constante, 6303681 e 6144226, aos 7 e 15 dias. Para o grupo de 28 dias, a média foi de 4436107,33, sendo que, nesse grupo, um apresentava biomaterial fora do corte histológico e dois outros biomaterial ausente ao centro da lesão.

ÁREA DA CICATRIZ

Somente um animal apresentou fechamento completo da epiderme do GE aos 28 dias e apresentou o valor de área da cicatriz de 50544322. O valor da área da cicatriz do GC, aos 28 dias, foi de 2556820. e do GE e GC, aos 60 dias, foi 4227631 e 2869387, respectivamente.

RESULTADO DA EXTENSÃO LINEAR DA FERIDA OU CICATRIZ

Foi medida a extensão linear da ferida da epiderme não reepitelizada ou da cicatriz nas porções com epiderme cicatrizada.

Observou-se ainda uma lesão aberta (sem epiderme) no GE e no GC, aos 7 e 15 dias, e, no GE, aos 28 dias. Os demais grupos de corte biológico 28 e 60 dias apresentaram área de cicatriz com formação de epiderme em toda a extensão.

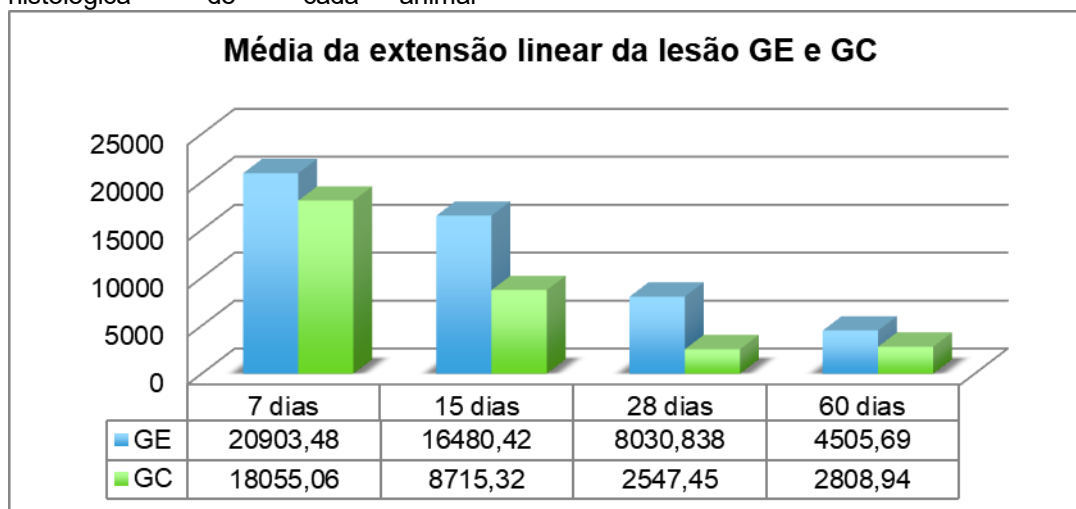
A medida dessa extensão linear mostra que a média do GE foi maior que a do GC, variando de 20903,48 até 2808,94 (Tabela 4 e Gráfico 7).

Tabela 4 – Medida da extensão linear da lesão realizado em microscopia ótica. Cálculo das respectivas médias de acordo com o ponto de corte biológico aos 7,15, 28, e 60 dias do GE e GC

	GE 7 dias	GC 7 dias	GE 15 dias	GC 15 dias	GE 28 dias	GC 28 dias	GE 60 dias	GC 60 dias
Extensão linear da lesão	18948,39	19429,86	17632,67	6869,69	9633,18	2548,89	3500,91	4598,36
	20140,44	11858,55	19536,60	6438,58	7644,55	2304,56	5890,07	2790,41
	18489,31	19891,29	13677,66	9010,91	10582,09	2085,96	5301,66	3235,46
	21963,25	21499,72	14073,96	13999,10	5046,65	3470,14	5198,78	2412,19
	23060,74	15964,96	15025,84	6913,69	12782,18	3663,91	2613,90	2203,34
	22818,76	19685,98	18935,79	9060,02	2496,38	1211,26	4528,87	1613,88
Média	20903,48	18055,06	16480,42	8715,32	8030,838	2547,45	4505,69	2808,94

Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 7 – Média da extensão linear da lesão para os grupos GE e GC na avaliação histológica de cada animal



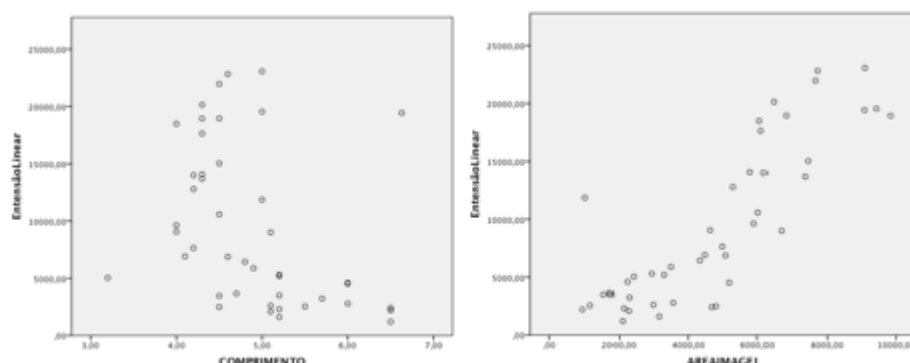
Fonte: Dados da pesquisa

Resultado da correlação entre extensão linear e área e comprimento da lesão

A correlação entre o GE e o GC e as variáveis da avaliação da macroscopia (área da lesão e comprimento da lesão) e da microscopia (extensão linear da lesão) foram avaliadas. O gráfico de dispersão entre a extensão linear de lesão e o comprimento da lesão mostrou-se não linear. E o

gráfico de dispersão entre a extensão e a área da lesão mostrou uma tendência linear (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Avaliação da dispersão entre as variáveis sem o uso de microscopia (comprimento e área da lesão) e a variável de extensão linear da lesão



Fonte: Dados da pesquisa

Foi realizada a correlação não paramétrica para as variáveis de comprimento e extensão linear com os grupos GE e GC. A correlação de Spearman mostrou que há uma correlação negativa e de magnitude moderada entre extensão linear da lesão e seu comprimento, para o grupo de controle ($\rho = -0,458$; $p = 0,042$), e que não houve correlação para o grupo experimental ($\rho = -0,208$; $p = 0,329$) (Tabela 5). A magnitude foi definida pela interpretação do ρ .

Tabela 5 – Avaliação da correlação entre a área e o comprimento da lesão no dorso do animal, medidos nos pontos de corte biológico, e a extensão linear da lesão, calculada por microscopia

Grupos		Extensão Linear	Comprimento
GE	Extensão linear	Correlações de coeficiente	1,000
		Sig. (2 extremidades)	.
		N	24
	Comprimento	Correlações de coeficiente	-,208
		Sig. (2 extremidades)	,329
		N	24
GC	Extensão linear	Correlações de coeficiente	1,000
		Sig. (2 extremidades)	-,458*
		N	20
	Comprimento	Correlações de coeficiente	-,458*
		Sig. (2 extremidades)	,042
		N	20

Fonte: Dados da pesquisa

Foi realizada uma correlação paramétrica para as variáveis área da lesão e extensão linear com os grupos GE e GC.

O coeficiente de correlação de Pearson mostrou que há uma correlação positiva e de magnitude muito forte entre extensão linear da lesão e área da lesão, sendo ela maior para o grupo experimental ($\rho = -0,849$; $p < 0,01$). Houve correlação positiva e de magnitude forte para o grupo de controle ($\rho = 0,725$; $p < 0,01$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Correlação entre área da lesão, calculada pelo ImageJ, e a extensão linear da lesão, calculada por microscopia

Grupos		Área da lesão	Extensão linear
GE	Área da lesão	Correlação de Pearson	1
		Sig. (2 extremidades)	,849**
		N	,000
	Extensão linear	Correlação de Pearson	24
		Sig. (2 extremidades)	,849**
		N	,000
GC	Área da Lesão	Correlação de Pearson	1
		Sig. (2 extremidades)	,725**
		N	,000
	Extensão linear	Correlação de Pearson	20
		Sig. (2 extremidades)	,725**
		N	,000

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Fonte: Dados da pesquisa

Resultado da regressão linear simples para extensão linear e área e comprimento da lesão

Para regressão da variável comprimento e extensão linear, foi identificado que o dado comprimento prevê um número baixo de casos R^2 0,142. $F(1,42) = 6,944$, $p = 0,012$; $R^2 = 0,142$, sendo melhor utilizar a variável de área da lesão para prever.

Foi utilizada a regressão linear simples para verificar se a área da lesão avaliada com macroscopia seria capaz de prever a variável extensão linear da lesão com microscopia (Tabela 7 e 8; Gráfico 9). A análise resultou em um

modelo estatisticamente significativo: $F(1,47) = 101,598$; $p < 0,01$; $R^2 = 0,708$. A área da lesão ($\beta = 0,841$; $t = 10,005$; $p < 0,001$). A equação que descreve essa relação é a extensão linear = $-1856,289 + 2,386 \times (\text{área da lesão})$.

Tabela 7 – Resumo do Modelo. Cálculo de R^2 e teste de Durbin-Watson

Resumo do modelo ^b					
Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa	Durbin-Watson
1	,841 ^a	,708	,701	3807,80707	1,376

a. Preditores (Constantes): área da lesão.

b. Variável dependente: extensão linear.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 8 – Teste ANOVA para regressão linear simples entre a extensão linear e a área da lesão

ANOVA ^a						
Modelo		Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
	Regressão	1473108662,599	1	1473108662,599	101,598	,000 ^b
1	<u>Resíduos</u>	<u>608974575,885</u>	<u>42</u>	<u>14499394,664</u>		
	Total	2082083238,484	43			

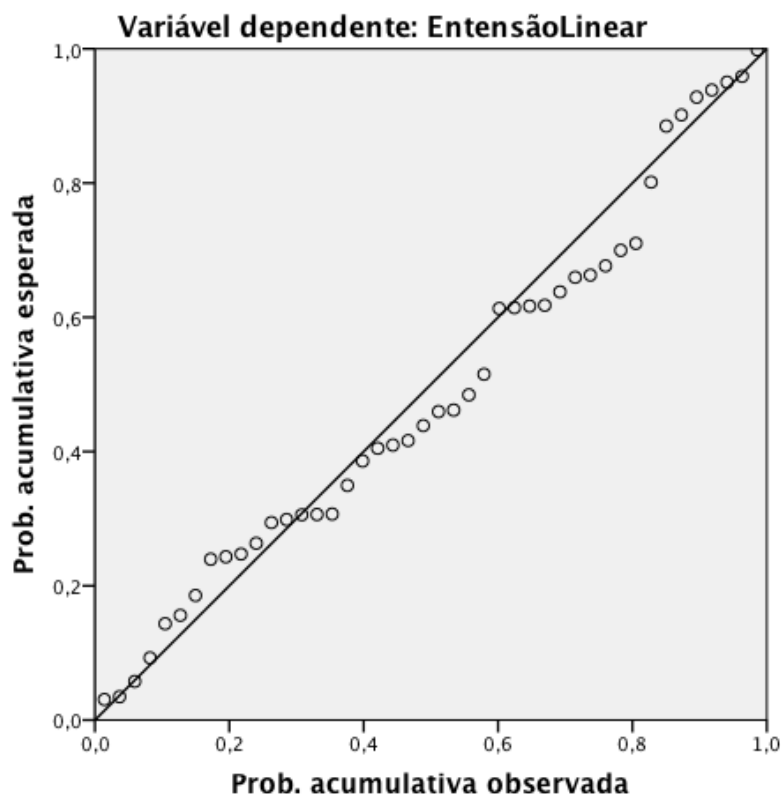
a. Variável dependente: extensão linear

b. Preditores (Constantes): área da lesão

Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 9 – Regressão para as variáveis extensão linear e área da lesão

Gráfico P-P normal de regressão Resíduos padronizados



Fonte: Dados da pesquisa

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

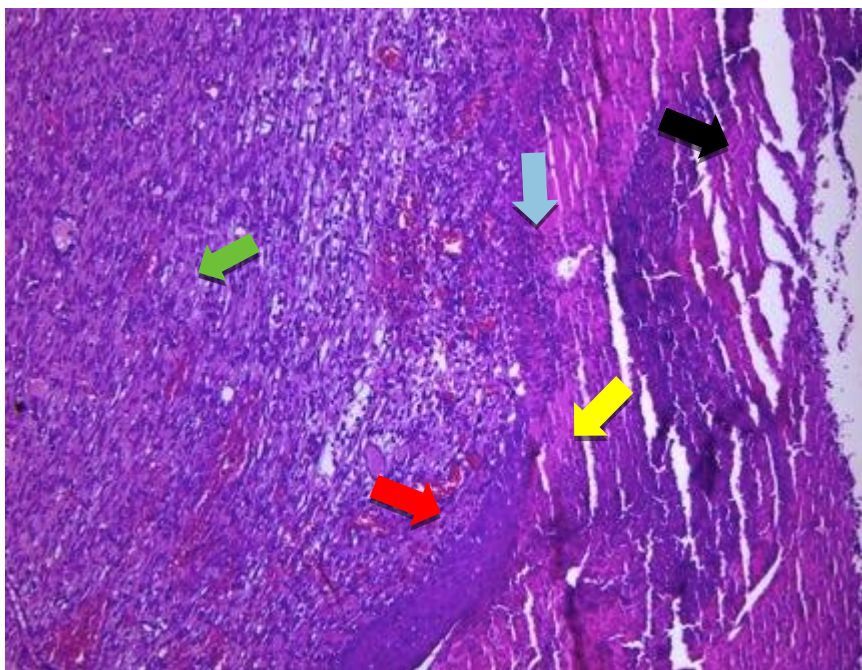
Aos 7 dias, o grupo de controle apresentava exsudato fibrino leucocitário e tecido de granulação mais desorganizado, se comparado ao grupo experimental.

Aos 15 dias, exibiu um tecido purulento (em algumas amostras) e tecido de granulação organizado, no grupo experimental.

O grupo de controle (30 dias) apresentou-se com cicatriz formada, e o grupo experimental com regiões centrais cruentas.

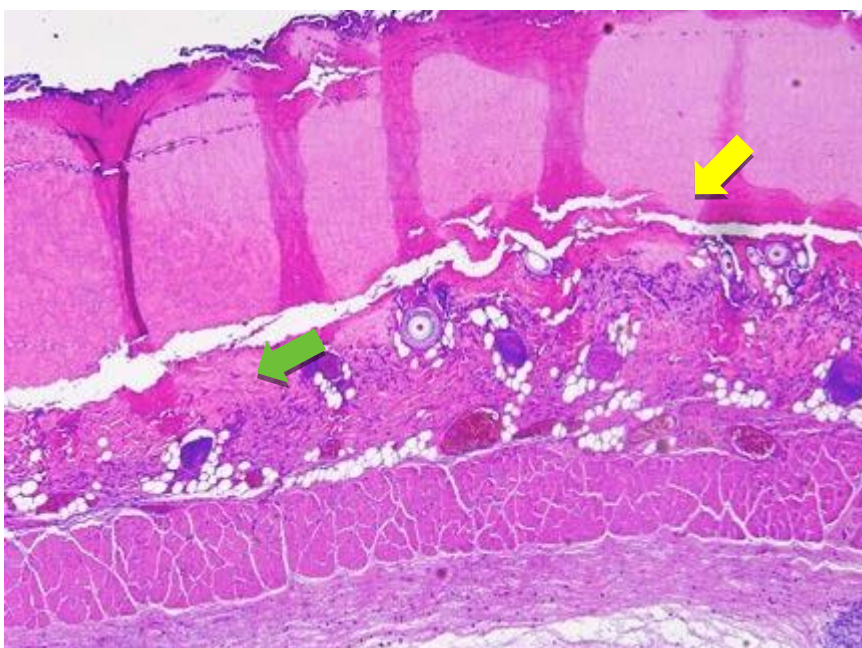
O grupo de controle (60 dias) apresentou-se com cicatriz mais espessa (Figuras de 6 a 14).

Figura 6 – Região de interface entre derme queimada e escarectomia. Apresenta lesão térmica em região de interface, em epiderme e derme subjacentes (seta amarela). Superfície apresenta lesão extensa, edema com proliferação vascular (seta vermelha), infiltrado de polimorfonucleares e presença de fibroblastos com deposição de colágeno (seta verde). Região mais superficial evidencia região de crosta (seta preta) e intensa presença de exsudato fibrino leucocitário (seta azul). GC001 - HE 5x



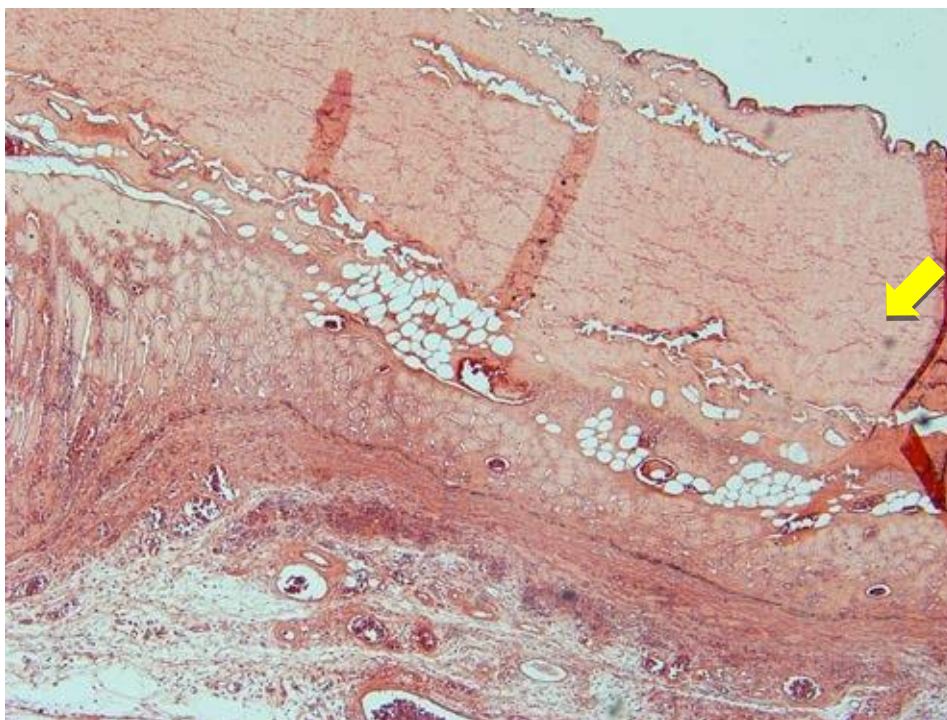
Fonte: Autoria própria

Figura 7 – Região de contato: matriz de pericárdio descelularizada e derme (seta amarela). Reação inflamatória com fibroblastos abundantes e fibras colágeno, posicionada mais paralelamente que nos grupos de controle para esse mesmo período (seta verde). GE003 - HE 5x



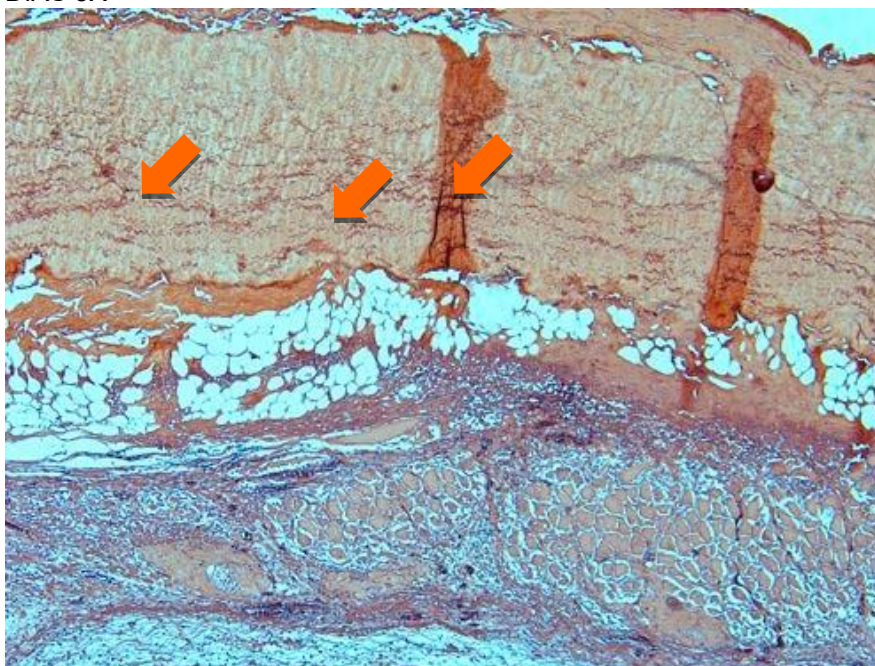
Fonte: Autoria própria

Figura 8 – Grupo experimental com cobertura de biomaterial. O corte histológico mostra o biomaterial (amarelo) rico em colágeno e fibras elásticas recobrindo a area queimada. GE 008 ORSEINA 7 DIAS 5X



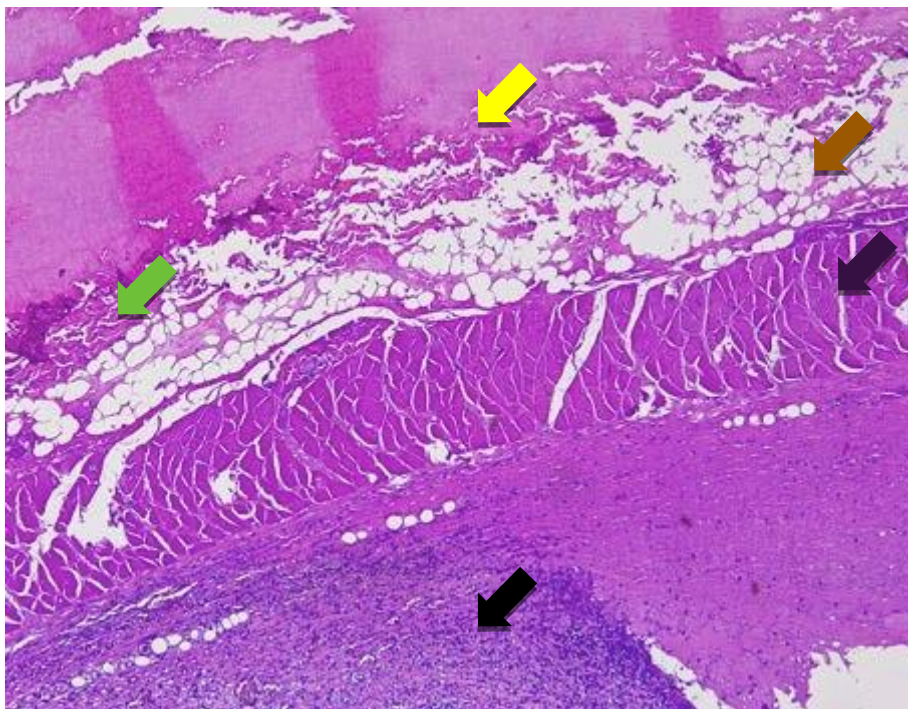
Fonte: Autoria própria

Figura 9 – Grupo experimental apresentando cobertura de biomaterial.(seta amarela) No período de 15 dias, não apresenta muita alteração em região de interface com o biomaterial. As regiões escuras espiraladas (laranja) indicam uma grande quantidade de fibra elástica nesse material em 15 dias. Percebe-se uma boa delimitação entre os planos. GE 001 ORSEINA 15 DIAS 5X



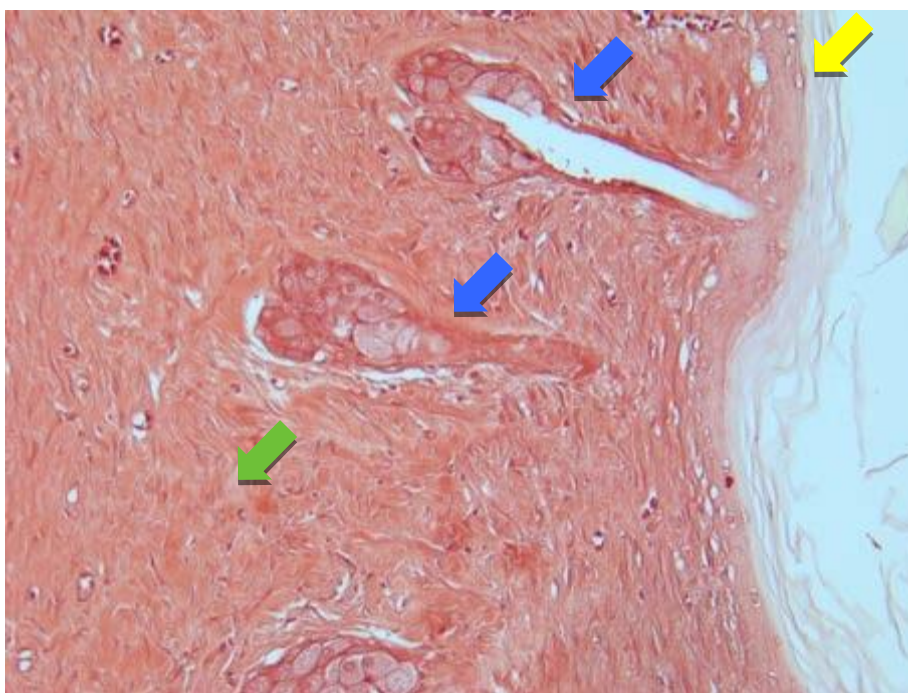
Fonte: Autoria própria

Figura 10 – Presença de exsudato granulomatoso inflamatório no pós-operatório de 15 dias (seta preta). Localiza-se, principalmente, em região mais próxima da interface de borda e do contato com o tecido de queimadura, e mais distante da zona de interface do biomaterial (seta amarela). Imagem apresenta região de tecido de granulação (seta verde) próxima ao biomaterial com pouca reação, área de tecido subcutâneo (seta marrom) e tecido muscular (seta roxa). GE005 HE 5x



Fonte: Autoria própria

Figura 11 – Tecido de cicatrização central com 60 dias do GE (seta verde). Mostra epiderme formada e ausência de biomaterial em interface (seta amarela). Mostra ainda anexos cutâneos e folículos (seta azul) em região próxima à cicatriz central. GE 019 20X ORSEÍNA 60DIAS



Fonte: Autoria própria

Figura 12 – Histomorfologia: corados com HE e aumento de 5x. No lado esquerdo, apresenta lâminas do GE (A,C, E) e, à direita, lâminas referentes aos ratos GC (BDF), ordenados conforme o tempo de corte histológico 7 dias (AB), 15 dias (CD) 28 dias (EF). Imagens AB mostram contato de biomaterial e crosta em contato com tecido de granulação subjacente. A mostra grumo de bactérias mantidas externamente acima do biomaterial e pouca reação inflamatória com tecido com menos polimorfonucleares e organizados com menor intensidade. B apresenta exsudato fibrino leucocitário mais intenso sobre um tecido de granulação espesso e mais desorganizado. EF mostram área de cicatriz em lâmina de grupo de controle com epitelização da epiderme, e E apresenta área de epitelização abaixo do biomaterial, apresentando ainda áreas de tecido de granulação. GE003HE 5x GC001HE 5x GE005HE 5x GC009HE 5x GE018HE 5x GC004HE 5x

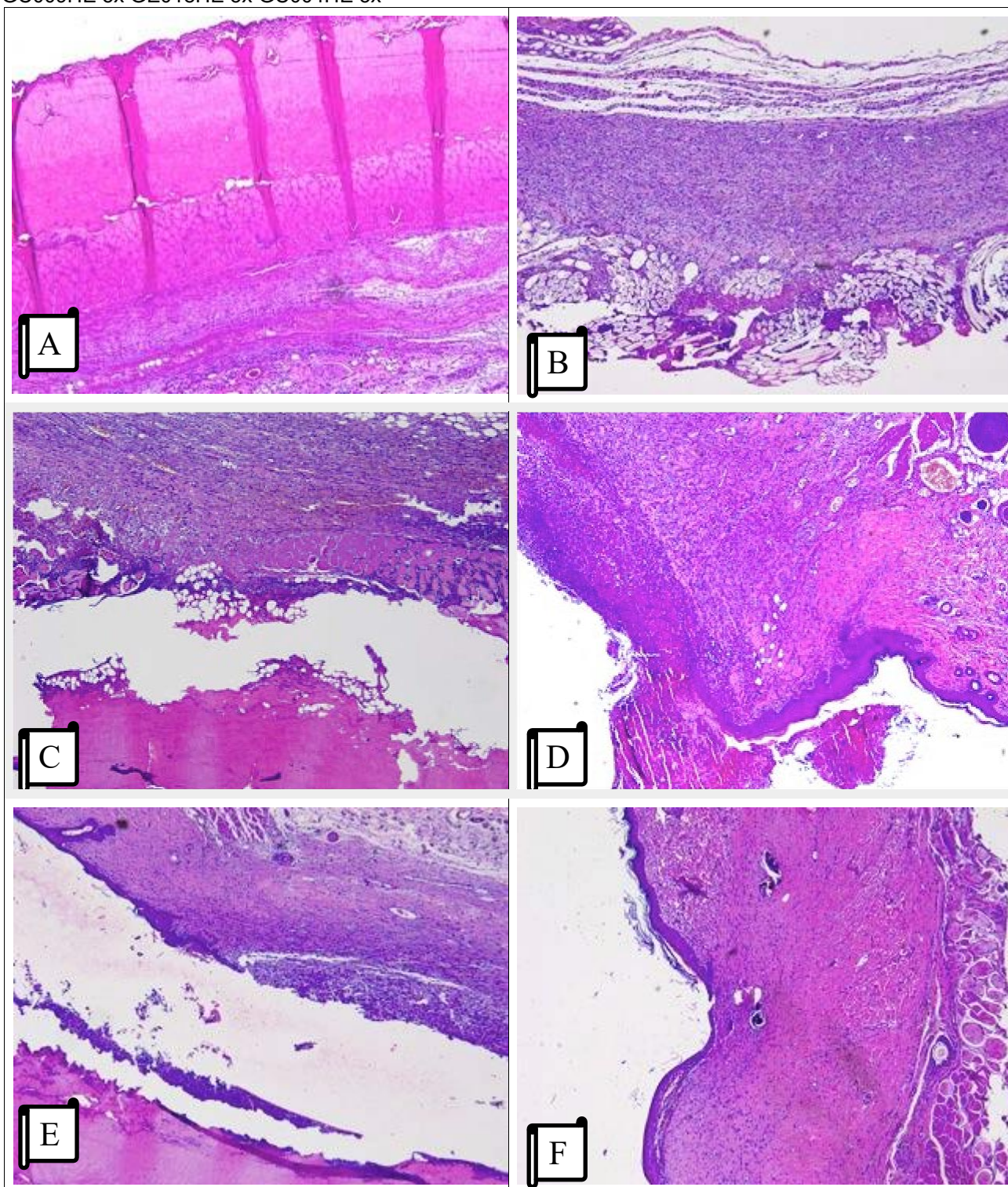


Figura 13 – Histomorfologia: corados com HE e aumento de 10x. No lado esquerdo, apresenta lâminas do grupo experimental (A,C, E), e, à direita, lâminas referentes aos ratos do GC (B,D,F), ordenados conforme o tempo de corte histológico: 7 dias (AB), 15 dias (CD) e 28 dias (EF). Imagens evidenciam padrão de reticularização do tecido de granulação, sendo que o grupo experimental (AC) apresenta tecido de granulação menos exuberante, com menos edema e menos infiltrado inflamatório, revelando mais tecido fibroso e fibras de colágeno dispostas mais paralelamente para o mesmo período de pós-operatório (BD). No período de corte histológico com 28 dias, o grupo de controle (F) apresenta reepitelização da epiderme e uma cicatriz mais densa, quando comparado com o grupo do biomaterial (E). GE008HE 10x GC001HE 10x GE009HE 10x GC009HE 10x GE018HE 10x GC004HE 10x

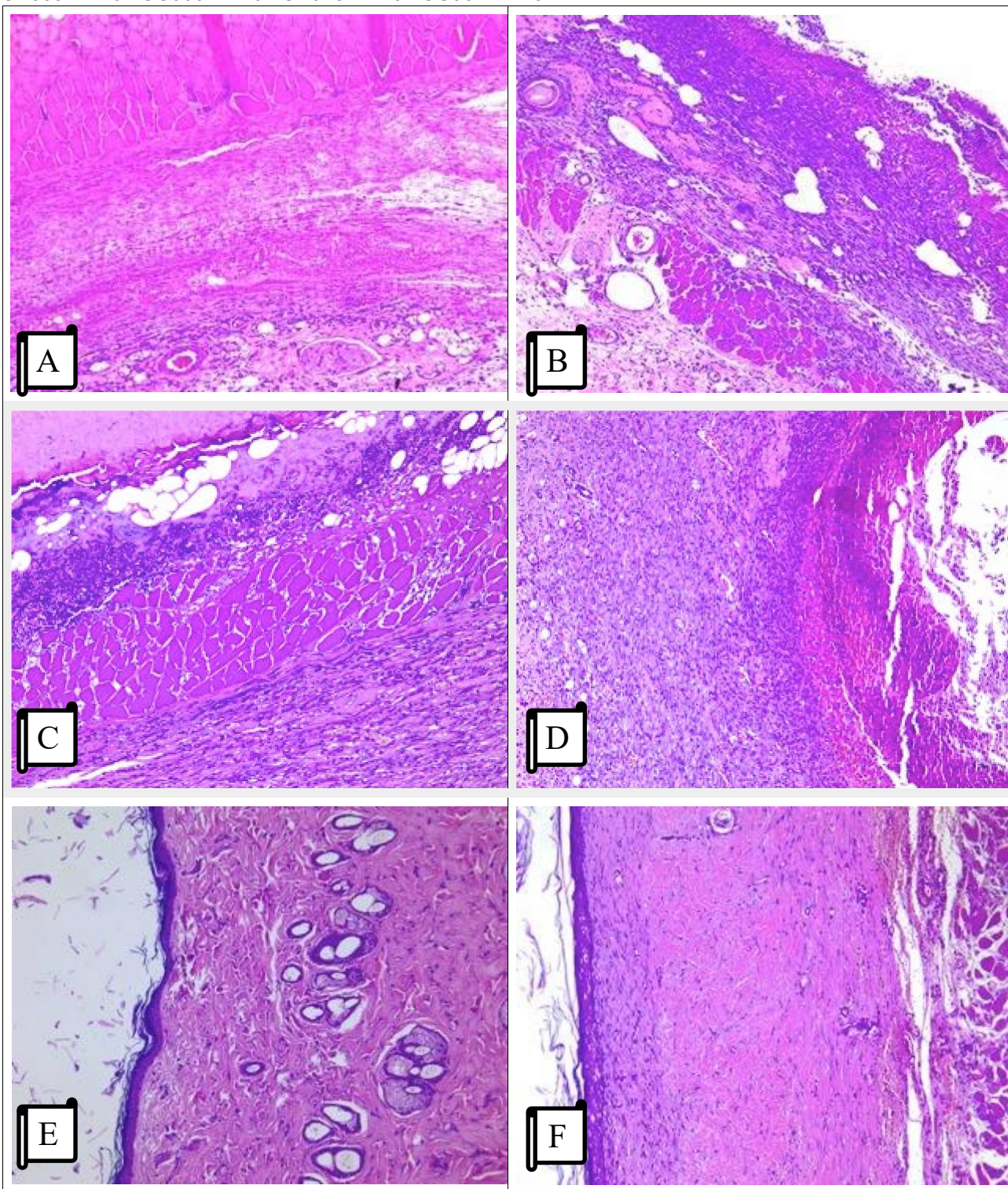
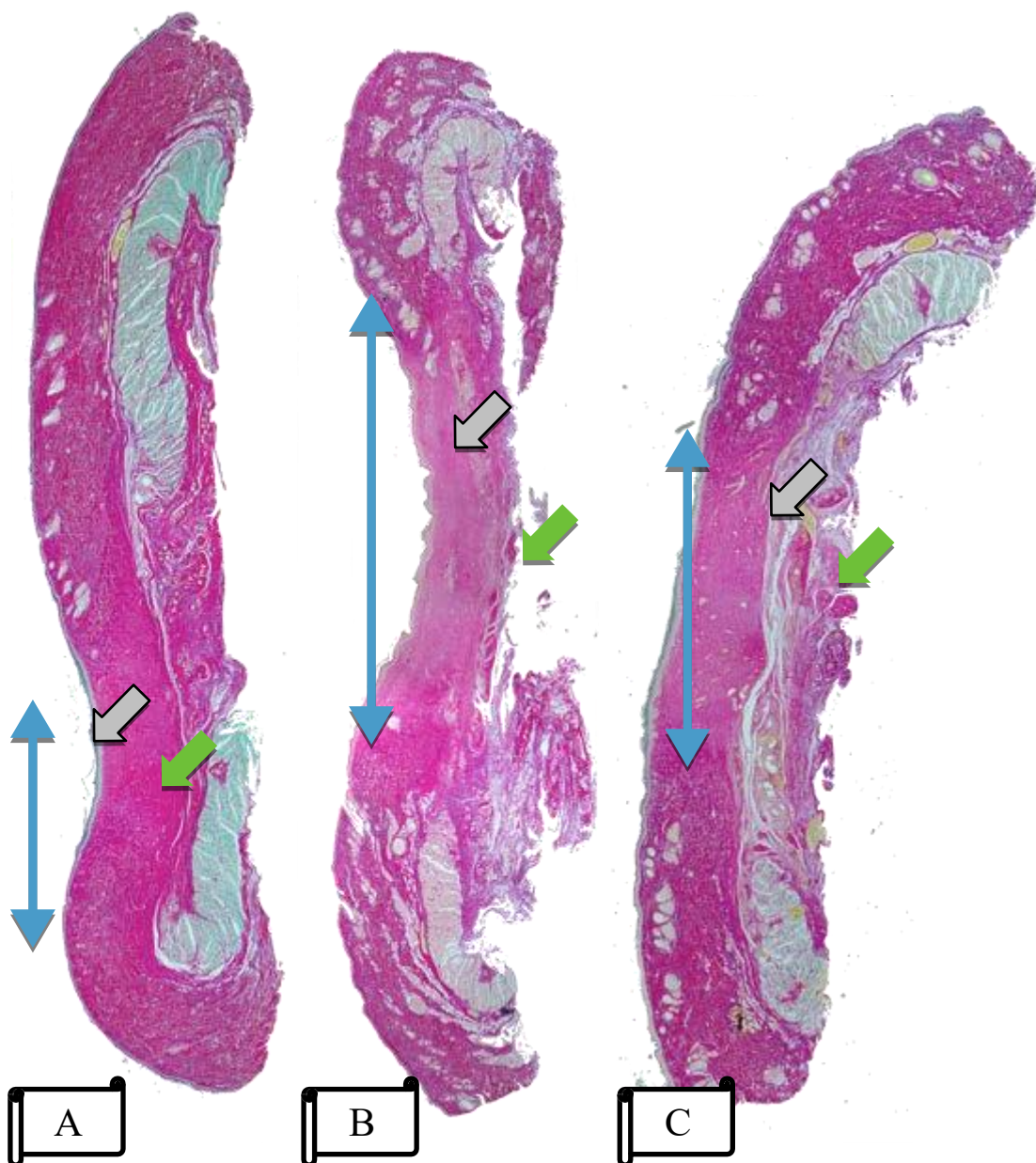


Figura 14 – Composição de corte histológico da derme. A – Presença de homogeneidade de coloração em porção central, compatível com processo cicatricial. Predomínio de fibrose (seta verde) e diminuição da espessura da derma para amostra do GC. B. Presença de cicatriz com tecido de granulação em maior extensão linear, no mesmo período de 60 dias (seta azul). C tecido com 28 dias mostra epiderme (seta cinza) formada e tecido de granulação.



Fonte: Autoria própria

7 DISCUSSÃO

O modelo experimental se mostrou apropriado para queimadura de terceiro grau, realizada por período de 20 segundos (s) com barra de latão aquecida com água, com aproximadamente 99 graus celsius.¹⁶ Em outro estudo, foi realizada queimadura de 90 graus por escaldadura, por 1s, 3s, 6s, 9s e, a partir de 3 s, atingiu-se o plano muscular profundo abaixo do músculo panniculus.¹⁹ Todas as amostras do presente estudo apresentavam alguma alteração em porção profunda ou com tecido de granulação ou fibrose.

No processo de cicatrização dos animais, o músculo *panniculus carnosus* pode interferir com mudança do formato da ferida e da cicatriz. Houve uma tendência de aumento do comprimento da lesão, paralelo ao eixo da coluna dorsal do animal. O rato apresenta, em sua anatomia, o músculo estriado *panniculus carnosus*, que interfere no processo de cicatrização e fechamento de uma ferida. No ser humano, algumas partes do corpo apresentam sinais desse músculo vestigial, que, com a evolução da espécie, não exerce a mesma função, mas pode ser visto com auxílio da microscopia em tecidos do subcutâneo humano, como fibras desconectadas. Os músculos semelhantes, nos humanos, aqueles como o platisma, palmar *brevis*, *cremaster*.²⁰

O biomaterial pode ter papel decisivo na estabilidade da ferida durante o tratamento.²¹ A medida de comprimento da lesão, paralela ao comprimento da coluna do animal, mostrou fraca correlação com a medida da microscopia de extensão linear da ferida. Foi feita outra correlação com a medida da área calculada; essa variável, com um R^2 expressivo, consegue prever a extensão linear da ferida, avaliada com microscopia, mesmo com material de pericárdio recobrimo a lesão e impossibilitando a visualização. A correlação da área da lesão com a extensão linear mostrou-se mais forte para o GE que para o GC.

Com relação à área observada e calculada pelo ImageJ, a lesão do GC apresentou grande variação, alcançando os maiores e menores valores. O biomaterial, no estudo, pode ter interferido na manutenção e na estabilidade do formato da lesão. No grupo experimental, o biomaterial se apresentava fixado no dorso na maioria dos animais, sendo que todos eles apresentaram dano por provável mordedura do rato. A realização de tratamento de longa duração com

biomateriais requer alguns cuidados, que foram tomados, como a escolha da zona receptora do biomaterial e a forma de fixação. Entretanto o próprio animal, acondicionado individualmente, tenta retirar o tratamento, o que pode interferir no resultado em longo prazo. Os autores Yao, et al.²¹ mostram que esse processo de cicatrização pode sofrer interferência, com contração e fechamento da ferida, podendo ser realizado um controle com o uso de uma membrana para manter, em longo prazo, a estabilidade da lesão causada por queimadura, permitindo avaliar a lesão por um prazo maior. Entretanto esse estudo limitou os achados a um prazo de até cinco dias após a queimadura.

O tratamento do paciente queimado ideal é na fase aguda.³ Entre as prioridades do tratamento, procura-se promover uma intervenção rápida, para evitar o processo de contração da ferida e uma reepitelização ou cicatrização após uma contração secundária importante.^{2,3} A contração pode resultar em sinéquias, aderências, e alteração da função dos tecidos, como dificuldade de movimentar um membro ou realizar a adequada da função das mãos, ou promover abertura e oclusão palpebral, por exemplo. O posicionamento do biomaterial estudado pode permitir a oclusão inicial da lesão e interferir na cicatrização com menor frequência de contrações teciduais e sinéquias, possibilitando o tempo necessário para o tratamento definitivo.

O resultado da medida da extensão linear da ferida ou cicatriz, assim como a medida de sua área, demonstrou ser uma forma eficiente de quantificar o quanto o tratamento e o não tratamento interferiram na lesão. Foi possível identificar que, para os animais do grupo experimental, além de um tecido de cicatrização menos denso, houve uma maior extensão linear da lesão que do no GC. Dessa forma, o uso de biomaterial poderia permitir a manutenção por mais tempo da arquitetura da lesão até o momento em que o paciente tivesse condições clínicas para tratamento definitivo^{6,7} e, nas queimaduras mais superficiais, possibilitaria uma reepitelização com uma cicatriz mais fina, e menos contraída.^{1,21}

Em outro estudo realizado com dextran hydrogels e Integra, outro biomaterial de colágeno bovino, foi possível visualizar mecanismo semelhante no período inicial de 7 dias, com melhor migração celular e neovascularização, verificando-se uma melhor vascularização nesses tecidos que nos grupos de controle. Nesse estudo, os animais foram acompanhados até 21 dias e foram visualizados anexos cutâneos que se desenvolviam dentro do arcabouço,

diferentemente do que foi visto no biomaterial de colágeno bovino.²² Todavia a presença do biomaterial mostrou-se inicialmente como uma barreira contra o contato de bactérias nesse processo inicial de cicatrização, da mesma forma que no estudo com esse biomaterial de pericárdio bovino. Neste estudo, foi verificado um processo inflamatório com tecido de granulação mais organizado que o do grupo de controle, nos primeiros sete dias, sendo que esse grupo apresentou ainda um exsudato granuloso leucocitário extenso. Essas alterações podem ter sido responsáveis pela formação de um tecido de granulação mais intenso nesse primeiro tempo.

O pericárdio aderiu à superfície da área de escarectomia e queimadura, mostrando-se biocompatível. Não apresentou aumento do processo inflamatório com sete dias e não apresentou reação de corpo estranho ou tentativa de degenerar o biomaterial. A morfometria mostrou que ele se manteve com o tamanho estável, através da análise do campo e medição da área na lâmina, nos períodos de sete e 15 dias. Com 28 dias, o biomaterial ainda estava presente sobre os animais, embora uma parte do tecido subjacente a ele já estivesse cicatrizado, interferindo na aderência das bordas, inclusive durante o corte para a inclusão da parafina e o processamento histológico. Com 60 dias, apresetacava somente a cicatriz, sem presença do biomaterial sobre a superfície.

O uso de biomateriais para interagir com queimaduras é descrito na literatura.^{6,7,11} Muitas vezes, eles propiciam um meio mais úmido, e a cobertura pode proteger as estruturas subjacentes, permitindo um processo de cicatrização mais rápido^{1,23} mesmo que, no controle histológico, não seja vista alteração inflamatória ou diminuição do processo de contração tecidual inicial. Como foi visto no uso de filmes de Glycosaminoglycan hydrogel²³, nosso estudo mostrou mais estabilidade do formato da ferida para o grupo experimental. As alterações da arquitetura do biomaterial aumentaram no decorrer dos dias do pós-operatório, sendo visível maior dano no formato em dois animais, com 28 dias de pós-operatório.

A presença pontual de infecção associada a dois animais do grupo de 15 dias pode estar associada às propriedades do biomaterial, que podem interferir e evoluir com infecção, mas não é possível excluir a contaminação no momento da aplicação, ou no pós-operatório do animal. A modificação de biomateriais pode, inclusive, ser suplementada com a aplicação de antibiótico,

e isso pode ajudar no uso deles para tratamento ou para evitar contaminações e infecções.²⁴

Alteração da arquitetura desse biomaterial pode ser sugerida com a realização de fenestrações, como é feito no enxertos de pele, para prevenir acúmulo de exsudato ou outra forma de fixação, com pontos descontínuos .

Aos 60 dias, observou-se um processo de cicatrização mais intenso no grupo de controle, com mais fibrose depositada na derme e no subcutâneo, além de uma camada basal da epiderme com maior presença de células. A formação de uma cicatriz mais espessa foi observada no grupo de controle. Transferindo-se esse resultado para a aplicação em seres humanos, tal procedimento poderia resultar em cicatrizes hipertróficas, ou mesmo queloidianas, visto que ratos não apresentam essa alteração patológica. Seria necessário observar por maior tempo no pós-operatório do grupo experimental, para verificar se a cicatriz que usou o biomaterial apresenta esse mesmo efeito de epiderme mais espessa do que no grupo controle. O uso de biomateriais pode auxiliar na formação de cicatrizes com menor espessura ou não.²⁵

A medição da espessura da epiderme, no grupo experimental, mostrou espessura menor que a observada nos grupos de controle, embora sem significância estatística, o que sugere a possibilidade de cicatriz com tecido menos contraído e uma epiderme mais fina.

Uma limitação de todo estudo com pesquisa experimental com animal é a transferência dos resultados para as condições com seres humanos. Todavia é imprescindível a realização desses procedimentos para se avaliar a biocompatibilidade ou as interações com o biomaterial. Biocompatibilidade é a capacidade de desencadear uma resposta do hospedeiro adequada na aplicação específica, ou seja, constitui uma característica fundamental de um material para não exercer qualquer efeito negativo sobre organismos vivos, células isoladas ou seus ambientes biológicos. É conhecida também como condição de elegibilidade para implantação de um objeto em seres humanos ou animais.²⁶ Neste estudo, houve uma boa adesão do biomaterial, pois não foram constatadas, com a microscopia, reações do tipo corpo estranho, ou que sugerissem incompatibilidade.

8 CONCLUSÃO

O biomaterial de pericardio bovino descelularizado foi biocompatível, promoveu a estabilidade da lesão e auxiliou no reparo da lesão cutânea por queimadura.

REFERÊNCIAS

1. Smaniotto PhdeS, Ferreira MC, Isaac C, Galli R. Systematization of dressings for clinical treatment of wounds. *Rev Bras Cir Plást.* 2012 Dec; 27(4):623-6.
2. Sterling JP, Heibambach DM, Gibran NS. Management of the burn wound. *Trauma and Thermal Injury.* 2010;1:01-10.Doi:102310/7800.S07C15.
3. Pereima MJL, Goulart BC, Pereima RR, Feijó R, Freitas JL. Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa. *Rev Bras Queimaduras.* 2013; 12(3):145-52.
4. Cleland H, Wasiak J, Dobson H, Paul M, Pratt G, Paul E, et al. Clinical application and viability of cryopreserved cadaveric skin in severe burn: a retrospective analysis. *Burns.* Melbourne, 2014; 41(5): 61-6.
5. Khoo TL, Halim AS, Saad AZ, Dorai AA. The application of glycerol-preserved skin allograft in the treatment of burn injuries: an analysis based on indications. *Burns.* 2010; 36:897-904.
6. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater.* 2009; 8(1):15-23.
7. Ziupos P. Recent development in the study of failure solid biomaterials and bone: 'fracture' and 'pre-fracture' toughness. *Material Science and Engineering C.* 1998; 6(1): 33-40.
8. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snow-balling threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* 2009; 17:763-71.
9. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Advances in wound care.* 3(8): 511-29, 2014.
10. Braille DM, Soares MJF, Souza DRS, Ramirez VDA. Mapping of bovine pericardium: physical and histopathologic tests. *J Heart Valve Dis.* 1998 Mar; 7(2):202-6.
11. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology.* 2008; 20:86-100.
12. Zambuzzi WF, Fernandes GV, Iano FG, Fernandes Mda S, Granjeiro JM, Oliveira RC. Exploring an organic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. *Braz Dent J.* 2010; 23(4):315-21.
13. Giuliani A, Manescu A, Larsson E, Tromba G, Luongo G, Piattelli A, et al. In vivo regenerative properties of coralline-derived (Biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with beta-

tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation X-Ray microtomography. Clin. Implant. Dent Relat Res. 2013 Jan 25.

14. Goodman CM, Miller R, Patrick CW, Zheng B, Duman H, Johnston C, et al. Radiotherapy: effects on expanded skin. Plast Reconstr Surg 2002; 110:1080-3.

15. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFPde. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicação sem cirurgia experimental. Rev Assoc Med Bras. 2010; 56(1):103-1.

16. Meyer TNR, SILVA ALda. A standard burn model using rats. Acta Cir Bras. 1999 Oct; 14(4).

17. Rasband WS, ImageJ US. National Institutes of Health. [Internet]. [acesso em 2018 jan 28]. Disponível: em <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

18. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. "Image Processing with ImageJ". Biophotonics International. 2004; 1(7): 36-42.

19. Hamrahi V, Hamblin MR, Jung W, Benjamin JB, Paul KW, Fischman AJ, et al. Carter. Gram-Negative Bacterial Infection in Thigh Abscess Can Migrate to Distant Burn Depending on Burn Depth. 2012 Jul 26.

20. McGrath JA, Eady RA, Pope FM. Rook's Textbook of Dermatology. 7 ed. Blackwell Publishing. 2004:31.

21. Yao Z, Huang Y, Luo G, Wu J, He W. A biological membrane-based novel excisional wound-splinting model in mice (With video). Burn Trauma 2014; 2:196-200.

22. Sun G, Zhang X, Shen Yu-I, Sebastian R, Dickinson LE, Fox-Talbot K, et al. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011Dec; 108 (52): 20976-81. DOI: 10.1073/pnas.1115973108.

23. Kirker KR, Luo Y, Nielson JH, Shelby J, Prestwich GD. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. Biomaterials. 2002; 23:3661-71.

24. Shepherd J, Sarker P, Rimmer S, Swanson L, MacNeil S, Douglas I. Hyperbranched poly(NIPAM) polymers modified with antibiotics for the reduction of bacterial burden in infected human tissue engineered skin. Biomaterials. 2011; 32:258-67.

25. Ault P, Plaza A, Paratz J. Scar massage for hypertrophic burns scarring- a systematic review. Burns. 2018; 4179(17):30296-6. Doi: 10.1016/j.burns.2017.05.006.

26. Koller M. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. Molecules. 2018; 23:362.

ANEXO



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O uso do biomaterial de colágeno bovino acelularizado para tratamento de queimadura e reconstrução de mama", registrada com o nº 115/2017, sob a responsabilidade de Dra. Fabiana Palm Rosa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 14/07/2017.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/07/2017 a 08/09/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)
Número de animais	134 ratos
Peso/Idade	300g / 10 - 14 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Escola de Medicina Veterinária - UFBA


Prof. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva

Coordenadora da CEUA-ICS

Prof.ª Luciana Lyra Casais e Silva
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

APÊNDICE

Avaliação das fotografias e medidas no momento da eutanásia

Tabela 9 - Área da Lesão nos pontos de corte biológico. Registro da área da ferida ou cicatriz calculado pelo programa de captação de pixels.

	GE 7 dias	GC 7 dias	GE 15 dias	GC 15 dias	GE 28 dias	GC 28 dias	GE 60 dias	GC 60 dias
Área da lesão	6442	9083	6109	5084	5905	1190	1574	2231
	6065	1040	9428	4340	4992	2128	3493	3561
	7651	*	7353	6668	4809	2269	2939	2287
	9092	*	5792	6186	6023	1769	3294	4686
	7712	*	7440	4484	2414	1750	2984	970
	6109	*	9843	4637	5299	2091	5190	3153
Média	7294	9715	7661	5233	4907	1866	3246	2814

* Dados perdidos

Tabela 10 - Comprimento da lesão nos pontos de corte biológico. Medida do comprimento do eixo paralelo a coluna registrado no momento da dissecação das amostras.

	GE 7 dias	GC 7 dias	GE 15 dias	GC 15 dias	GE 28 dias	GC 28 dias	GE 60 dias	GC 60 dias
Compri mento	4,50	6,63	4,30	4,60	4,00	5,50	5,20	6,00
	4,30	5,00	5,00	4,80	4,20	5,20	4,90	6,00
	4,00	*	4,30	5,10	4,50	5,10	5,20	5,70
	4,50	*	4,30	4,20	3,20	4,50	5,20	6,50
	5,00	*	4,50	4,10	4,20	4,70	5,10	6,50
	4,60	*	4,30	4,00	4,50	6,50	6,00	5,20
Média	4480	5650	4450	4460	4100	5250	5200	5980

* Dados perdidos

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatístic a	df	Sig.	Estatístic a	df	Sig.
Área da lesão	,101	44	,200*	,959	44	,118
Comprimento	,146	44	,019	,936	44	,016

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Avaliação da epiderme

Tabela 11 - Espessura da epiderme nos pontos de corte biológico de 28 e 60 dias realizado em microscopia óptica. Medida de espessura realizada em 3 segmentos de extensão da lâmina e calculado a média.

Medições	Esquerda	Centro	Direita	Média	DP- δ
RC004	92,19	81,8	89,44	87,81	5,38
RC006	103,46	84,17	99,18	95,60333333	10,1301744
RC007	80,12	102,16	159,61	113,96333333	41,0384458
RC008	88,99	74,8	98,72	87,50333333	12,02909944
RC010	66,08	74,64	70,74	70,48666667	4,285619364
RC012	104,92	119,17	87,4	103,83	15,91302297
Total GC 28 dias				93,2050	
RE014	77,49	81,63	62,12	73,75	10,28
RE017	130,66	122,04	107,53	120,0766667	11,68932134
RE019	90,24	69,02	54,96	71,40666667	17,76067942
RE020	84,81	45	50,07	59,96	21,66952007
RE021	78,15	107,48	56,68	80,77	25,50114311
RE023	52,96	62,89	65,71	60,52	6,697260634
Total GE 60 dias				78,6983	
RC015	98,7	134,38	117,89	116,99	17,86
RC016	74,55	82,39	107,17	88,03666667	17,02732314
RC018	73,55	74,64	76,64	74,94333333	1,567173677
RC020	101,02	89,17	98,46	96,21666667	6,23538558
RC021	52,33	48,52	48,51	49,78666667	2,202596952
RC024	58,96	86,36	102	82,44	21,78612402
Total GC 60 dias				85,2167	

Estatísticas de grupo

	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Espessura Epiderme	Experimento 60	6	78,6983	22,11402	9,02801
	Controle 60	6	85,2167	21,50459	8,77921

Estatísticas de grupo

	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Espessura Epiderme	Experimento 60	6	78,6983	22,11402	9,02801
	Controle 30	6	93,2050	15,01373	6,12933

Teste de amostras independentes										
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença	
									Inferior	Superior
EspessuraEpiderme	Variancias iguais assumidas	,001	,979	-,518	10	,616	-6,51833	12,59284	-34,57692	21,54026
	Variancias iguais não assumidas			-,518	9,992	,616	-6,51833	12,59284	-34,57989	21,54322

Avaliação do tecido de granulação 7 e 15 dias

Tabela 12 - Espessura do tecido de granulação realizado em microscopia óptica . Medida de espessura realizada em 3 segmentos de extensão da lâmina e calculado a média.

Medições	Esquerda	Centro	Direita	Média	DP-δ
RE002	982,3	583,64	350,16	638,70	319,65
RE003	175,01	212,8	467,59	285,1333333	159,1378253
RE006	223,49	262,74	193,31	226,5133333	34,8135984
RE008	49,97	55,34	84,91	63,40666667	18,81500022
RE010	247,22	171,75	158,03	192,3333333	48,02571429
RE012	804,58	927,95	1020,48	917,67	108,3164867
RC001	543,38	913,39	915,56	790,78	214,25
RC003	1559,47	1987,4	1443,59	1663,486667	286,4383515
RC005	793,02	803,41	1002,31	866,2466667	117,9487644
RC013	513	1050,7	1109,87	891,19	328,855636
RC017	263,1	206,05	494,29	321,1466667	152,6356316
RC023	1379,77	1465,76	1476,83	1440,786667	53,13107785
RE001	596,42	478,55	170,06	415,01	220,17
RE004	1376,83	1659,23	1442,24	1492,766667	147,8247206
RE005	825,4	480,13	384,98	563,5033333	231,7450725
RE007	389,29	735,09	272,88	465,7533333	240,4048711
RE009	462,19	378,63	112,41	317,7433333	182,6660936
RE011	205,66	242,16	319,55	255,79	58,15553026
RC002	1165,56	802,47	689,46	885,83	248,76
RC009	742,3	909,83	744,11	798,7466667	96,20524535
RC011	1010,56	1062,85	714,35	929,2533333	187,9392004
RC014	1628,79	1806,73	1483,16	1639,56	162,0536359
RC019	819,12	819,38	874,29	837,5966667	31,77762473
RC022	461,39	412,72	577,36	483,8233333	84,58145916
RE013	449,17	731,53	592,96	591,22	141,19
RE015	2173,49	2173,49	2173,49	2173,49	0
RE018	602,22	372,71	439,54	471,49	118,0436864
RE022	3183,31	2541,46	2565,13	2763,3	363,9318168
RE024	305,92	394,65	188,99	296,52	103,1517276
RE016	1309,66	1387,46	1429,75	1375,623333	60,91372615
RC004	1653,31	1941,54	1810,27	1801,71	144,31
RC006	1309,27	1326,95	1485,16	1373,793333	96,85063982
RC007	1622,66	1405,87	1933,54	1654,023333	265,2294313
RC008	1261,2	1152,97	1145,28	1186,483333	64,8206698

RC010	1335,71	1196,94	1241,05	1257,9	70,90289204
RC012	2384,62	2331,41	2372,67	2362,9	27,91801748
RE014	1986,98	1862,12	1774,03	1874,38	107,00
RE017	2276,14	2164,63	1892,94	2111,236667	197,1007256
RE019	689,36	1026,95	1495,3	1070,536667	404,734072
RE020	1704,85	1881,45	1235,86	1607,386667	333,6479253
RE021	1384,13	1268,45	1660,3	1437,626667	201,3281541
RE023	1425,72	1458,79	1291,64	1392,05	88,51571781
RC015	1838,69	1753,14	2073,08	1888,30	165,64
RC016	1627,41	1804,23	1711,19	1714,276667	88,45040267
RC018	1856,44	1861,99	1931,65	1883,36	41,91233351
RC020	1942,18	1965,8	1935,77	1947,916667	15,81556933
RC021	2177,78	1869,03	2117,18	2054,663333	163,593676
RC024	1843,83	1811,67	1870,79	1842,096667	29,59809003

Fonte: Elaborado pelo autor

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatístico a	df	Sig.	Estatístico a	df	Sig.
Espessura do Tecido Granulação	,132	24	,200 [*]	,937	24	,141

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Teste-T

Estatísticas de grupo

	grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Espessurado Tecido Granulação	experimento	12	486,1936	391,79124	113,10039
	controle	12	1267,6350	528,27703	152,50044

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença	
									Inferior	Superior
Espessurado Tecido Granulação	Varianças iguais assumidas	1,423	,246	-4,116	22	,000	-781,44139	189,86333	-1175,19383	-387,68895
	Varianças iguais não assumidas			-4,116	20,290	,001	-781,44139	189,86333	-1177,12666	-385,75612

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk
--	---------------------------------	--------------

	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
EspeessuradoTecidoGranulação7dias	,186	12	,200*	,922	12	,304
EspeessuradoTecidoGranulação15dias	,199	12	,200*	,923	12	,310

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Teste-T

Estatísticas de grupo

	grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
EspeessuradoTecidoGranulação15dias	experimento	6	585,0944	457,69512	186,85325
	controle	6	1606,1350	439,22521	179,31294
EspeessuradoTecidoGranulação7dias	experimento	6	387,2928	323,63670	132,12413
	controle	6	929,1350	382,16800	156,01943

Teste de amostras independentes									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% intervalo de confiança da diferença
									Inferior Superior
EspeessuradoTecidoGranulação15dias	Varíâncias iguais assumidas	,036	,854	-3,943	10	,003	-1021,04056	258,97349	-1598,06944 -444,01167
	Varíâncias iguais não assumidas			-3,943	9,983	,003	-1021,04056	258,97349	-1598,20203 -443,87908
	Varíâncias iguais não assumidas								
EspeessuradoTecidoGranulação7dias	Varíâncias iguais assumidas	,033	,859	-2,650	10	,024	-541,84222	204,44767	-997,38001 -86,30443
	Varíâncias iguais não assumidas			-2,650	9,736	,025	-541,84222	204,44767	-999,06104 -84,62340
	Varíâncias iguais não assumidas								

Tabela 13 - Espessura da derme normal nos pontos de corte biológico de 28 e 60 dias realizado em microscopia óptica. Medida de espessura realizada em 3 segmentos de extensão da lâmina e calculado a média.

Medições	Esquerda	Centro	Direita	Média	DP-δ
RC004	2215,3	2292,67	2249,5	2252,49	38,77
RC006	2379,52	2436,86	2377,79	2398,056667	33,61580333
RC007	3072	3339,44	3220,33	3210,59	133,9857795
RC008	2520,45	2571,66	2733,09	2608,4	110,9788858
RC010	2762,67	2888,29	3072,93	2907,963333	156,062798
RC012	2734,13	2946,7	3244,53	2975,12	256,3841109
Total GC 28 dias				2688,93	
RE014	2938,01	2909,6	2752,88	2866,83	99,70
RE017	3171,5	3221,83	3379,47	3257,6	108,5011516

RE019	3217,44	3711,59	3392,33	3440,453333	250,565255
RE020	3073,16	3086,21	3533,72	3231,03	262,2184256
RE021	2490,38	2489,61	2518,27	2499,42	16,32911816
RE023	2129,47	2022,83	206,681	1452,993667	1080,654649
Total GE 60 dias	2849,78				
RC015	3041,57	3225,36	3330,88	3199,27	146,41
RC016	3031,79	3172,75	2637,66	2947,4	277,3474015
RC018	2658,79	2693,13	2654,39	2668,77	21,21078028
RC020	2876,44	2781,79	2870,19	2842,806667	52,93430677
RC021	3148,27	3215,66	3228,05	3197,326667	42,93361659
RC024	2691,2	2845,56	2970,08	2835,613333	139,7058185
Total GC 60 dias	2898,77				

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 14 – Área do Tecido de Granulação

	GE 7 dias	GC 7 dias	GE 15 dias	GC 15 dias
Area	3484570,25	4372974,5	2480273,25	4164219,25
tecido	1883107,5	9323227	2593534	4247382
Grânula	1211439,38	4660838,5	2895640,25	4551950,5
ção	333520,47	4421518	2313375	7282815
	1121123,75	871020,5	2287840,5	4649419
	4225540,5	6419605,5	1531630	2625584,75
Média	5011530,66	2350382,16		
	2043216,975	7	7	4586895,083

Fonte: Elaborado pelo autor

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatístic a	df	Sig.	Estatístic a	df	Sig.
ÁreaTecidoGranulaç ão	,167	24	,082	,932	24	,107

a. Lilliefors Significance Correction

Estatísticas de grupo

	grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
ÁreaTecidoGranulaç ão	experimento	12	2196799,570 8	1072924,238 97	309726,549 09

controle	12	4799212,875 0	2143718,122 64	618838,117 59
----------	----	------------------	-------------------	------------------

Teste de amostras independentes									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença
									Inferior Superior
Área Tecido Granulação	Variancias iguais assumidas	1,674	,209	-3,761	22	,001	2602413,30417	692019,61749	4037574,15134 1167252,45699
	Variancias iguais não assumidas			-3,761	16,186	,002	2602413,30417	692019,61749	4068063,72065 1136762,88749

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatístic a	df	Sig.	Estatístic a	df	Sig.
Área da Cicatriz	,169	12	,200*	,961	12	,797

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Teste-T

Estatísticas de grupo

	grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Área da Cicatriz	experimento	6	4227631,2917	1353679,18565	552637,21338
	controle	6	2869387,4583	983214,65888	401395,70365

Teste de amostras independentes									
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença
									Inferior Superior
Área da Cicatriz	Variancias iguais assumidas	2,794	,126	1,989	10	,075	1358243,83333	683027,37904	163636,00687 2880123,67354
	Variancias iguais não assumidas			1,989	9,127	,078	1358243,83333	683027,37904	2900089,36302 183601,69635

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk
--	---------------------------------	--------------

	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Área do Biomaterial	,192	12	,200*	,941	12	,511

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Estatísticas de grupo

	Dias	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Área do Biomaterial	7 dias	6	6303680,9583	2124228,64426	867212,71257
	15 dias	6	6144226,0000	864032,04556	352739,60551

Teste de amostras independentes									
	Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para igualdade de Médias						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença	
Área do Biomaterial	2,287	,161	,170	10	,868	159454,95833	936206,77104	Inferior	Superior
								1926543,7217	2245453,6383
									8
Área do Biomaterial	2,287	,161	,170	10	,868	159454,95833	936206,77104	Inferior	Superior
								1926543,7217	2245453,6383
									8
Área do Biomaterial	2,287	,161	,170	10	,868	159454,95833	936206,77104	Inferior	Superior
								1926543,7217	2245453,6383
									8
Área do Biomaterial	2,287	,161	,170	10	,868	159454,95833	936206,77104	Inferior	Superior
								1926543,7217	2245453,6383
									8

Tabela 15 – Medida da Área do Biomaterial realizado em microscopia óptica. Verificado presença em amostras do GE com 7, 15 e 28 dias.

	GE 7 dias	GE 15 dias	GE 28 dias
Área do Biomaterial	5365534	7548116	4582791.50
	6774903,5	5917828,5	
	3130354,75	5721023	6162731.50
	5809046,5	5301368,5	
	9510480	6827713,5	2562799.00
	7231767	5549306,5	
Média			4436107,33
	6303680,958	6144226	

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 16 – Medida da Espessura do Biomaterial realizado em microscopia óptica. Verificado presença em amostras do GE com 7, 15 e 28 dias. Medida de espessura realizada em 3 segmentos de extensão da lâmina e calculado a média.

Medições	Esquerda	Centro	Direita	Média	DP-δ
RE002	918,02	920,08	727,67	855,26	110,50
RE003	1023,16	1139,53	1002,31	1055	73,94370359
RE006	433,5	456,37	322,71	404,1933333	71,48712775
RE008	985,48	975,63	953,65	971,5866667	16,29566302
RE010	1778,98	1667,98	1519,68	1655,546667	130,0963617
RE012	1224,37	1103,14	1151,21	1159,573333	61,04618934

Total GE 7 dias				889,12	
RE001	1364,05	1266,52	1284,78	1305,12	51,85
RE004	1185,15	905,23	1012,58	1034,32	141,2206511
RE005	967,2	917,69	935,58	940,1566667	25,07028985
RE007	861,73	967,75	1027,42	952,3	83,91853728
RE009	1117,83	1073,71	973,52	1055,02	73,94816495
RE011	794,89	781,08	617,69	731,22	98,56203478
Total GE 15 dias				992,62	
RE013	702,05	815,72	931,08	116,99	17,86
RE015	*	*	*		
RE016	*	*	*		
RE018	929,38	873,6	1153,29	74,94333333	1,567173677
RE022	*	*	*		
RE044	402,98	468,14	316,88	396	75,87118821
Total GE 28 dias				195,97	

Fonte: Elaborado pelo autor

* Animais que não apresentaram biomaterial no seguimento do corte histológico.

Extensão linear da ferida ou cicatriz

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatístic a	df	Sig.	Estatístic a	df	Sig.
ExtensãoLinearCicatriz	,150	12	,200*	,942	12	,518

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

Teste-T

Estatísticas de grupo

	grupos	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
ExtensãoLinearCicatriz	experimento	6	4505,6983	1234,45855	503,96559
	controle	6	2808,9400	1033,11344	421,76680

Teste de amostras independentes										
		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de confiança da diferença	
									Inferior	Superior
ExtensãoLinearCicatriz	Variancias iguais assumidas	,378	,553	2,582	10	,027	1696,75833	657,16706	232,49887	3161,01780
	Variancias iguais não assumidas			2,582	9,699	,028	1696,75833	657,16706	226,31356	3167,20311

Tabela 17 – Medida da Extensão Linear da lesão realizado em microscopia óptica. Cálculo das respectivas medias de acordo com o ponto de corte biológico 7,15,28, e 60 dias do GE e GC.

	GE 7 dias	GC 7 dias	GE 15 dias	GC 15 dias	GE 28 dias	GC 28 dias	GE 60 dias	GC 60 dias
Extensão Linear da Lesão	18948,39	19429,86	17632,67	6869,69	9633,18	2548,89	3500,91	4598,36
	20140,44	11858,55	19536,60	6438,58	7644,55	2304,56	5890,07	2790,41
	18489,31	19891,29	13677,66	9010,91	10582,09	2085,96	5301,66	3235,46
	21963,25	21499,72	14073,96	13999,10	5046,65	3470,14	5198,78	2412,19
	23060,74	15964,96	15025,84	6913,69	12782,18	3663,91	2613,90	2203,34
	22818,76	19685,98	18935,79	9060,02	2496,38	1211,26	4528,87	1613,88
Média	20903,48	18055,06	16480,42	8715,32	8030,838	2547,45	4505,69	2808,94

Fonte: Elaborado pelo autor

Regressão entre extensão linear e área e comprimento da lesão

Estatísticas descritivas

	Média	Desvio padrão	N
Extensão Linear	9437,3043	6958,48694	44
Área da Lesão	4733,0455	2452,96697	44

Resumo do modelo^b

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa	Durbin-Watson
1	,841 ^a	,708	,701	3807,80707	1,376

a. Preditores: (Constante), Área da Lesão

b. Variável dependente: Extensão Linear

ANOVA^a

Modelo	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
1 Regressão	1473108662,599	1	1473108662,599	101,598	,000 ^b
Resíduos	608974575,885	42	14499394,664		
Total	2082083238,484	43			

a. Variável dependente: Extensão Linear

b. Preditores: (Constante), Área da Lesão

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.
	B	Modelo padrão	Beta		
(Constante)	-1856,289	1258,938		-1,474	,148
1 Área da Lesão	2,386	,237	,841	10,080	,000

a. Variável dependente: Extensão Linear

Estatísticas de resíduos^a

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	N
Valor previsto	458,2432	21630,2461	9437,3043	5853,06253	44
Resíduos	-7122,16064	11233,27832	,00000	3763,26978	44
Valor previsto padrão	-1,534	2,083	,000	1,000	44
Resíduo padrão	-1,870	2,950	,000	,988	44

a. Variável dependente: Extensão Linear

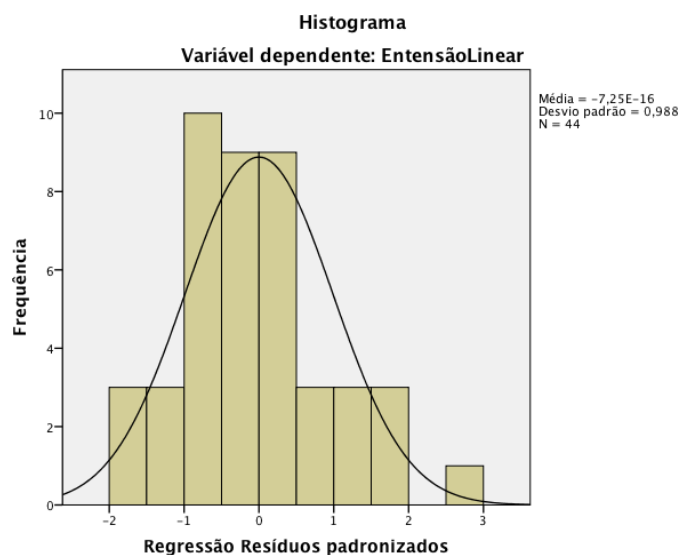
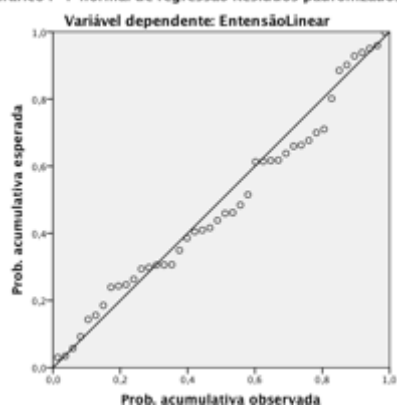
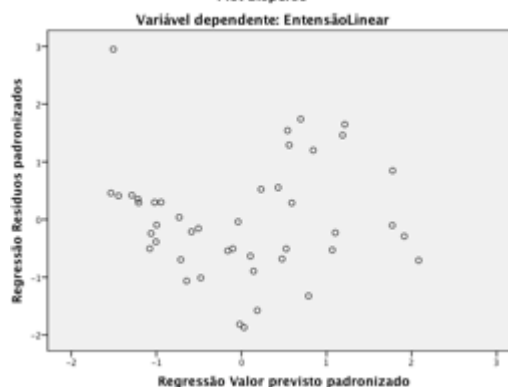


Gráfico P-P normal de regressão Resíduos padronizados



Plot disperso



Regressão

Estatísticas descritivas

	Média	Desvio padrão	N
COMPRIMENTO	4,9007	,78241	44
Extensão Linear	9437,3043	6958,48694	44

Resumo do modelo^b

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa	Durbin-Watson
1	,377 ^a	,142	,121	,73336	1,094

a. Preditores: (Constante), Extensão Linear

b. Variável dependente: Comprimento

ANOVA^a

Modelo	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
1 Regressão	3,735	1	3,735	6,944	,012 ^b
Resíduos	22,588	42	,538		
Total	26,323	43			

a. Variável dependente: Comprimento

b. Preditores: (Constante), Extensão Linear

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.
	B	Modelo padrão	Beta		
(Constante)	5,300	,188		28,240	,000
1 Extensão Linear	-4,235E-005	,000	-,377	-2,635	,012

a. Variável dependente: Comprimento

Estatísticas de resíduos^a

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	N
Valor previsto	4,3237	5,2491	4,9007	,29471	44
Resíduos	-1,88664	2,15253	,00000	,72478	44
Valor previsto padrão	-1,958	1,182	,000	1,000	44
Resíduo padrão	-2,573	2,935	,000	,988	44

a. Variável dependente: Comprimento

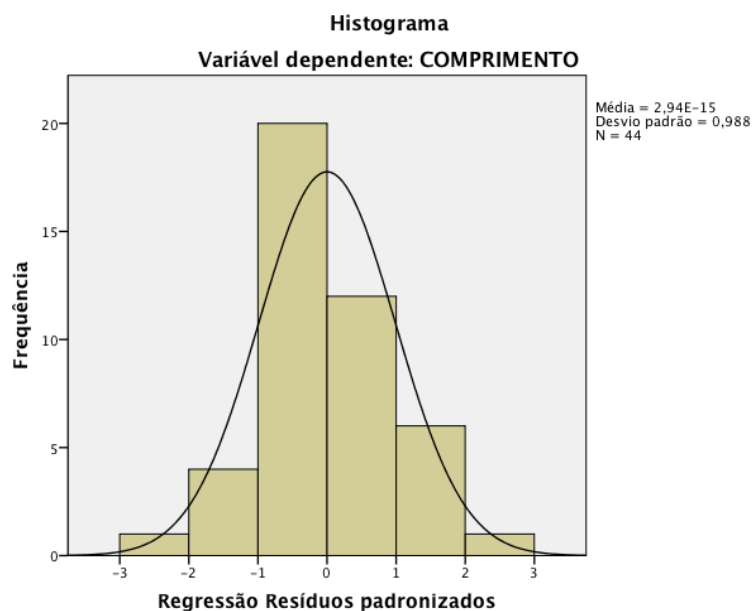
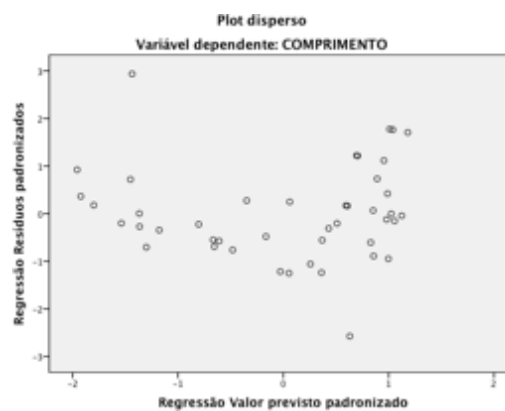
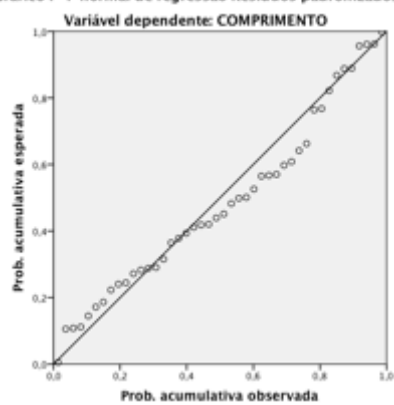


Gráfico P-P normal de regressão Resíduos padronizados





Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>