

ROZENIR RAMOS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA INTEGRAÇÃO DA MATRIZ
DE REGENERAÇÃO DÉRMICA AO ORGANISMO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

FLORIANÓPOLIS (SC)

2004

ROZENIR RAMOS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA INTEGRAÇÃO DA MATRIZ
DE REGENERAÇÃO DÉRMICA AO ORGANISMO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa
Catarina, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.

Coordenador: Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Orientador: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima

FLORIANÓPOLIS (SC)

2004

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurício José Lopes Pereima, meu orientador, pelo apoio e orientação recebidos durante todo o período da realização do estudo e elaboração da dissertação, sempre com intervenções sábias, dirimindo as dúvidas.

À minha esposa Maria Helena, pela paciência e compreensão durante as longas horas de estudo.

À minha filha Mariana, pelo estímulo dado à realização do mestrado e pelo auxílio na realização das cirurgias.

Ao amigo e colega Dr. Marcos Aurélio Antunes Machado pelo apoio dado durante os meus períodos de ausência do hospital.

Aos professores, pelo brilhantismo das aulas dadas e orientações transmitidas.

Ao Dr. Wilson Heinzen Cardoso, médico veterinário, que com brilhantismo realizou a anestesia nos animais.

Ao Dr. João Luiz Rocha, médico patologista, que deixou seus momentos de lazer para fazer a análise histológica das amostras colhidas.

Ao Ivo Dedicácio Soares e à Tânia Regina Tavares Fernandes, funcionários do Curso de Mestrado, pelo estímulo e apoio dados durante todo o período do Curso.

À Cristiani Meiro Alves, aluna bolsista da UNESC, responsável pelos cuidados com os animais no Biotério.

ÍNDICE

RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	14
3. MÉTODO	15
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50
8. NORMAS ADOTADAS	53
ANEXOS.....	54

RESUMO

Foi realizado um estudo experimental, randomizado e prospectivo, com a finalidade de analisar histologicamente a integração da matriz de regeneração dérmica. Foram utilizados 30 ratos albinos, da linhagem Wistar-EPM1, com idade em torno de 180 dias e peso variando de 250 a 300 gramas, divididos aleatoriamente em 3 grupos. Em todos os ratos foi realizada a retirada de um quadrado profundo de pele na região dorsal, com tamanho em torno de 4 cm². No Grupo Implante de Matriz Dérmica, cobriu-se a ferida com um enxerto de matriz de regeneração dérmica. No Grupo Enxerto Autólogo, utilizou-se um enxerto autólogo de pele, e no Grupo Cicatrização por Contração, aguardou-se a cicatrização espontânea. Biópsias foram realizadas com 7, 14 e 21 dias, e estudadas histologicamente em relação à resposta inflamatória, à regeneração da derme e ao desenvolvimento de fibrose. Os testes estatísticos com 21 dias ($p < 0,05$), mostraram significância para a presença de neutrófilos, neoformação dérmica, formação de canais vasculares, deposição de colágeno e formação de fibrose. O grupo da matriz de regeneração dérmica mostrou os melhores resultados, com menor processo inflamatório, menor formação de fibrose, maior deposição de colágeno, maior neoformação dérmica e maior formação de canais vasculares. No estudo realizado, foi possível conhecer com detalhes as diferentes fases da integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo, sendo que os resultados se assemelham aos da integração do enxerto autólogo de pele.

SUMMARY

It was held an experimental study randomized and prospective in order to analyze histologically the Dermal Regeneration Template integration. It was used 30 albino rats, Wistar-EPM1 type, around the age of 180 days and the weighing from 250 to 300 grams, divided randomly in 3 groups. In every rat was realized the drawn of a skin deep square on the dorsal area with a size around 4 cm². On the Dermal Template Implant Group was found out a wound with a graft on the Dermal Regeneration Template. On the Autologous Graft Group was used a skin autologous graft and in the Cicatrization Group by contraction was expected a spontaneous cicatrization. Biopsy was held with 7, 14 and 21 days and studied histologically in relation to an inflammatory response to the dermal regeneration and fibrosis development. The statistic tests with 21 days ($p < 0,05$) were significant for neutrophil presence, derm and vascular canals formation, collagen deposition, and fibrosis formation. The Dermal Regeneration Template Group showed the best results with lower inflammatory process and fibrosis formation; and higher collagen deposition, derm formation and vascular canals formation. In the studied held, it was possible to know with details the different dermal regeneration template integration phases, being that the results are similar to integration of the skin autologous graft.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão com estrutura e função complexa de difícil reposição quando sofre dano irreversível por queimadura, trauma ou doença. Ela possui dois componentes principais, a derme e a epiderme^{1,2,3,4}. A epiderme ou camada superficial, que é derivada do ectoderma embrionário, é uma fina camada de células originadas da proliferação de queratinócitos da camada basal^{1,3,4}.

A camada basal está intimamente relacionada com a camada superior da derme e aderida a esta por um elaborado sistema de conexão com fibras de proteína, dispostas ao longo de uma micro arquitetura de saliência e depressões em uma rede de estrias^{1,4}.

A divisão celular ocorre constantemente na camada basal e, desta maneira, as células recém-formadas são empurradas para cima. Como estas células progridem até atingirem a superfície, estes queratinócitos se diferenciam formando queratina e, eventualmente, formam a camada córnea, ou camada superficial. A epiderme, com esta camada queratinizada de células mortas, é a interface que dá imediata proteção contra a entrada de microorganismos, perda de água, de eletrólitos e de proteínas^{1,4,5}.

A derme é derivada do mesoderma e é composta por duas camadas que diferem na porosidade: a derme papilar e a derme reticular. A derme é composta primariamente de colágeno, glicosaminoglicanos e elastina, com uma variedade de outras matrizes protéicas. Ela é ricamente suprida de sangue, através de uma densa rede de capilares, chamada de plexo dérmico. A principal célula que constitui a derme é o fibroblasto, sendo que células do sistema imunológico e células do endotélio vascular também estão presentes em abundância. A derme é responsável pela resistência, elasticidade e qualidades táteis atribuídas à pele. Na profundidade da derme estão os anexos epidérmicos, que são os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. Estes anexos estão envolvidos nas funções de proteção e termo-regulação da pele^{1,4,5}.

Durante o desenvolvimento pré-natal, tanto o mesoderma como o ectoderma participam na formação da pele. Após o nascimento, a derme bem como a epiderme são essenciais para manter as funções básicas da pele de termo-regulação, defesa microbiológica, barreira à perda de líquido, defesa mecânica e reparo de lesões, imagem cosmética e pigmentação^{2,6}.

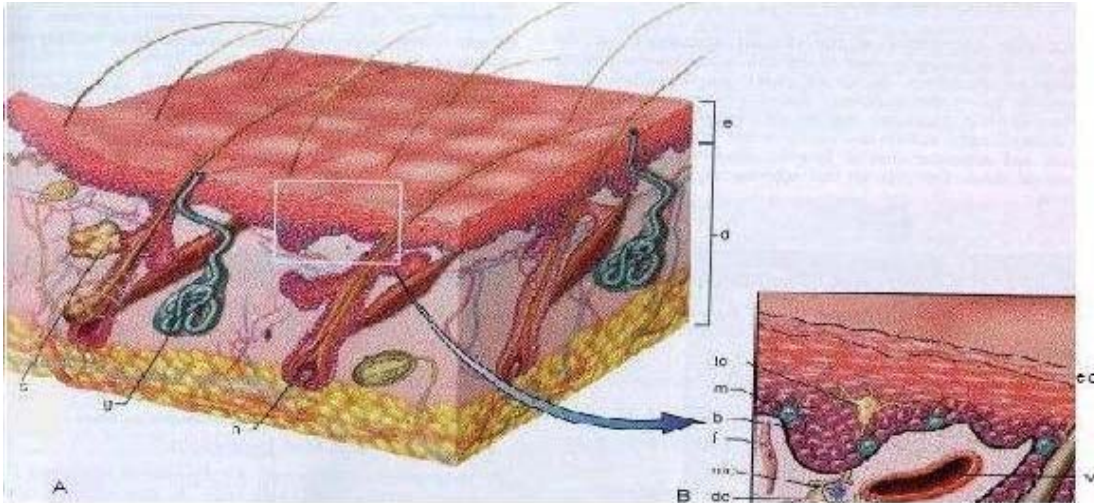


Figura 1:

A – A pele é formada por uma camada epidérmica (e) e por uma camada dérmica (d) de onde descendem os anexos especializados (foliculos pilosos (h), glândulas sudoríparas (g) e glândulas sebáceas (s)).

B – Detalhe da camada epidérmica (e) e da camada dérmica superficial mostrando a progressiva e constante maturação de células da camada basal (b) em direção às células do epitélio escamoso da camada córnea (ec). Melanócitos dendríticos contendo melanina (m) e células de Langerhans também estão presentes (lc). A derme superficial contém vasos (v), fibroblastos (f), células gigantes (mc) e dendrócitos (dc), potencialmente importantes na imunidade e reparo da derme.

FONTE: Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th edition

As lesões de pele são agrupadas clinicamente em três classes: epidérmica (primeiro grau), epidérmica e dérmica superficial (segundo grau) e epidérmica e dérmica profunda ou total (terceiro grau). A epiderme é capaz de se regenerar e lesões limitadas à epiderme curam pela migração de queratinócitos da periferia da ferida, de remanescentes da camada basal da base da lesão e da proliferação de queratinócitos das extremidades da lesão⁴.

Este processo regenera completamente a epiderme, sem deixar cicatrizes, e é chamada de re-epitelização.

A regeneração envolve a neutralização dos mediadores químicos e um posterior retorno à normalidade da permeabilidade vascular, a parada da infiltração leucocitária e, finalmente, a remoção do líquido de edema e de proteínas, leucócitos, corpos estranhos e restos necróticos do local, que é desempenhado pelos linfáticos e fagócitos⁵.

Por outro lado, a derme não se regenera. Quando uma porção de pele se perde por trauma ou queimadura, não ocorre a re-epitelização. Se a lesão é moderadamente superficial, uma confluência suficiente de derme provoca a re-epitelização, a partir de restos de epiderme e das extremidades da lesão, sem deixar cicatrizes ou contraturas significativas. No entanto, a

derme no local é permanentemente fina⁴.

Nas lesões de terceiro grau, onde não existem restos epidérmicos e pouco ou nenhum tecido dérmico, não pode haver regeneração e a proliferação de tecido de granulação cobre a lesão, como uma medida de defesa antibacteriana⁴.

A proliferação de fibroblastos no tecido de granulação produz colágeno de maneira exuberante⁷. Após, eles se diferenciam em miofibroblastos contráteis, que colocam as bordas da lesão numa proximidade suficiente para que os queratinócitos da periferia possam epitelizar a lesão. Esta forma de cicatrização é chamada de cicatrização por contração. Nas lesões acima de 2 cm, a contração não é suficiente e resulta numa ferida não epitelizada cronicamente⁴.

Usualmente, queimaduras de terceiro grau causam perdas extensas de pele. A sobrevivência destes pacientes tem sido marcada pelas modernas técnicas de cuidados intensivos, pela imediata remoção da pele queimada e pela aplicação de uma cobertura cutânea autóloga, obtida de uma área íntegra do corpo^{1,8,9,10}.

A imediata remoção da pele queimada retira os focos de tecidos necróticos que potencializam tanto a infecção, quanto a formação de complexos lipoproteicos (LPC) de efeito imunossupressor. A cobertura fisiológica ainda evita a intensa cascata inflamatória que ocorre nestes pacientes e elimina a freqüente perda de água, eletrólitos, proteínas e calor que levam a um estado de catabolismo acentuado^{8,11,12}.

A cicatrização de feridas é um fenômeno minuciosamente regulado que envolve vários processos, inclusive a indução de um processo inflamatório agudo pelo ferimento, a regeneração de células parenquimatosas, a migração e a proliferação de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas, a síntese de proteínas da matriz extracelular, o remodelamento do tecido conjuntivo e dos componentes parenquimatosos, a formação de colágeno e a aquisição de força pela ferida⁵.

Existem duas formas de cicatrização: a união primária ou cicatrização por primeira intenção e a união secundária ou cicatrização por segunda intenção⁵.

A cicatrização por primeira intenção é a que ocorre em uma incisão cirúrgica limpa, aproximada por suturas. A incisão gera a morte de um número limitado de células epiteliais e de células de tecido conjuntivo, assim como a quebra da continuidade da membrana basal epitelial. O espaço da incisão é imediatamente preenchido por sangue coagulado, que contém hemáceas e fibrina; a desidratação do coágulo de superfície forma a crosta que recobre a

ferida. Em 24 horas, surgem neutrófilos nas margens da incisão, que se deslocam na direção do coágulo de fibrina. A epiderme se espessa em sua margem seccionada em decorrência da atividade mitótica das células basais e, em 24 a 48 horas, surgem nas margens projeções de células epiteliais que migram e crescem ao longo de margens cortadas da derme e depositam componentes da membrana basal à medida que se deslocam. Estas células epiteliais se fundem na linha média, abaixo da superfície da crosta e produzem, deste modo, uma camada epitelial fina e contínua. Até o terceiro dia, os neutrófilos são, em sua maior parte, substituídos por macrófagos. O tecido de granulação invade progressivamente o espaço da incisão. O aparecimento do colágeno nas margens da incisão, se faz inicialmente com orientação vertical, sem construir pontes sobre a incisão. As células endoteliais continuam a se proliferar e espessam a camada epidérmica. Até o quinto dia, o espaço incisional é preenchido por tecido de granulação. A neovascularização atinge um pico. As fibras de colágeno tornam-se mais abundantes e começam a construir pontes sobre a incisão. A epiderme recupera sua espessura normal e a diferenciação das células de superfície originam uma arquitetura epidérmica madura com queratinização superficial⁵.

Durante a segunda semana, ocorre persistente acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, o edema e o aumento da permeabilidade vascular desaparecem em sua maior parte. Nessa ocasião, inicia-se o prolongado processo de empalidecimento da cicatriz, decorrente do acúmulo de colágeno na cicatriz incisional e da involução dos canais vasculares⁵.

Ao final do primeiro mês, a cicatriz compreende um tecido celular conjuntivo isento de infiltrado inflamatório e recoberto por uma epiderme íntegra. Os anexos dérmicos destruídos na linha da incisão são perdidos permanentemente⁵.

Quando a perda celular e tecidual é mais extensa, o processo de reparação é mais complicado. A regeneração de células parenquimatosas é incapaz de recompor integralmente a arquitetura original. Há um abundante crescimento de tecido de granulação a partir da margem para completar o reparo^{4,5}. Esta forma de cicatrização recebe o nome de união secundária ou cicatrização por segunda intenção. Vários aspectos diferenciam a cicatrização secundária da primária:

1. Inevitavelmente grandes defeitos teciduais apresentam, de início, uma quantidade maior de fibrina, de restos necróticos e exsudato a ser removida. Conseqüentemente, a reação inflamatória é mais intensa.

2. Formam-se quantidades muito maiores de tecido de granulação.
3. O aspecto que mais claramente diferencia a cicatriz primária da secundária é o fenômeno de contração da ferida, verificada em grandes feridas de superfície⁵. A contração tem sido atribuída, pelo menos em parte, à presença de miofibroblastos que são fibroblastos alterados que apresentam características ultra-estruturais de células musculares lisas^{4,5,13}.

As queimaduras térmicas continuam a ser um significativo problema clínico nos Estados Unidos, com aproximadamente 2,5 milhões de pessoas procurando cuidados médicos, 80.000 hospitalizações e 12.000 mortes anualmente^{4,14}.

Em grandes queimados com lesões de terceiro grau, a cobertura epidérmica após a remoção do tecido queimado é difícil, porque a área doadora é escassa e por não existirem, até o momento, coberturas epidérmicas permanentes. Estas lesões podem ser cobertas utilizando-se enxertos de sítios doadores não queimados ou que já sofreram epitelização. No entanto, estes pacientes necessitam esperar pela regeneração dos sítios doadores, podendo apresentar desequilíbrios metabólicos, dor, infecção e septicemia. Além disso, as sucessivas retiradas de tecido dos mesmos locais provocam dor e conseqüências cosméticas e funcionais como cicatrizes, alterações na pigmentação da pele e contratura^{2,15,16}.

A cobertura com tecido autólogo é o tratamento definitivo para as queimaduras parciais ou totalmente profundas^{1,6,7,8,9,10}.

O enxerto cutâneo autólogo deve conter uma razoável quantidade de derme, assim como, uma superfície epitelial que permita uma boa cobertura da derme. A espessura e continuidade do componente dérmico destes enxertos são os maiores determinantes que afetam o resultado funcional e cosmético da ferida coberta^{2,4,9}.

Embora o transplante autólogo de pele se mantenha como a mais comum forma de tratamento para pacientes com significativa perda de pele, existe um número grande de produtos que podem ser usados, para repor a pele temporária ou permanentemente¹².

A cicatrização do enxerto autólogo se dá porque as células, inicialmente, sobrevivem por embebição de nutrientes advindos dos tecidos onde está apoiado. Com o tempo se inicia a angiogênese, e capilares crescem na derme integrando definitivamente o enxerto¹⁷.

Muitas das seqüelas de queimadura como cicatrizes hipertróficas e quelóides, se desenvolvem devido aos enxertos epidérmicos serem feitos sobre fâscias ou tecidos de granulação, que não contêm derme. A derme fornece a base de colágeno para a epiderme

conferindo-lhe elasticidade, e quando ocorre a cicatrização funcionalmente imperfeita, a formação de fibrose proporciona uma forma de cura permanente, que permite que o tecido residual continue, de algum modo, a funcionar. Entretanto, às vezes, a própria cicatriz é tão grande e tem uma localização tal que gera uma disfunção permanente⁶.

Atualmente, existem pesquisas direcionadas para substitutos de pele permanentes, que tenham componentes epidérmicos e dérmicos^{12,18,19,20}.

Em relação às coberturas epidérmicas, em 1975, Green e cols introduziram o enxerto autólogo de cultura de epitélio e em 1981, O'Connor e cols descreveram o seu primeiro uso. Esta técnica, que é de alto custo e envolve tecnologia de ponta, requer múltiplas biópsias por punção, de pequenas áreas não queimadas, e colocação do material em meio de cultura durante aproximadamente 30 dias, para que o tecidos cultivados se tornem maduros e possam ser aplicados^{1,14}. A cobertura realizada por esses tecidos é variável, porque, após 30 dias de crescimento, se desenvolvem apenas 5-6 camadas finas de células, transparentes e extremamente friáveis. Essas coberturas mostram um sucesso que varia de 0 a 85%¹⁶.

No que diz respeito às coberturas dérmicas permanentes, existem disponíveis no mercado, matrizes de regeneração dérmica compostas por colágeno bovino e glicosaminoglicanos, e outras compostas de hialuronidase¹².

Segundo Jaksic e Burke, o substituto ideal da pele deve ser aderente, elástico, permitir a passagem de vapor de água, ser durável, fornecer uma barreira antibacteriana, ser atóxico e não antigênico, anti-séptico, homeostático, de fácil aplicação e remoção, e ser de baixo custo.

Em 1981, Burke e cols. introduziram o uso de uma matriz dérmica, a INTEGRA[®] - Matriz de Regeneração Dérmica¹, que é um sistema de membrana de duas camadas para reposição de pele, no tratamento de grandes queimados^{11,13}.

A camada de reposição dérmica é formada por uma matriz de fibras porosas de colágeno de polimerização cruzada do tendão bovino e um glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato), fabricada com um poro definido entre 70 e 200 micrômetros, uma estrutura similar à de uma camada de pele e com degradação programada^{7,10,15,21}. A camada de colágeno e glicosaminoglicano servem de molde para a regeneração da derme, ancorando a formação da nova derme. Uma cobertura temporária de polisiloxano (silicone) forma uma barreira funcional, normalmente feita pela epiderme, durante o período de integração do material sintético ao seu leito^{4,8,11,22}, evitando a perda de calor e água e a entrada de bactérias, até que

¹ Integra® Dermal Regeneration Template, Johnson & Johnson Medical Ltd, Skipton UK

a neoderme esteja em condições de receber um enxerto autólogo de epiderme.

O fluxo de água, por meio da camada de silicone, que é de 1 a 10 mg/cm² é a mesma que atravessa a epiderme normal, 0,5 ml/cm²/hr^{8,20}.

Inicialmente, as células inflamatórias migram para a matriz e sobrevivem por embebição de nutrientes, do leito coberto. Com o surgimento da angiogênese, os capilares crescem para dentro da matriz, sustentando a migração de células e a elaboração da nova derme⁵.

Em torno de 7 dias, a esponja de colágeno e glicosaminoglicano promovem a migração de fibroblastos, que começam a produzir mais matriz protéica extracelular e colágeno endógeno^{14,17}.

Após 14 dias existe uma extensa infiltração de células e matriz, preenchendo 2/3 da derme artificial¹. Dependendo da neovascularização formada, a camada de silicone é removida e um enxerto epidérmico extrafino autólogo é aplicado sobre a área cruenta. As células da epiderme proliferam e aderem à neoderme².

A matriz de colágeno tem uma estrutura tridimensional, aproximando-se da estrutura da pele normal, e é completamente biodegradável após 30 dias¹⁰. Durante este período, ela serve de base para a proliferação de fibroblastos e células endoteliais, facilitando a neoformação dérmica com função semelhante à pele normal^{6,24}.

Em um estudo com 131 pacientes com queimadura, nos quais foi aplicada a matriz de regeneração dérmica à base de colágeno, observou-se que o processo de cicatrização e reparo é dividido arbitrariamente em seis fases, que são reconhecidas por achados histológicos⁷:

Na fase I, que ocorre de zero a sete dias, nada de importante é observado;

A fase II, que ocorre de sete a dez dias, mostra uma predominância de macrófagos com alguns linfócitos e poucos fibroblastos. As células inflamatórias estão invadindo a matriz dérmica. As fibras de colágeno da matriz formam uma sustentação para as células, particularmente macrófagos, que têm uma aparente atividade. Estes grupos de macrófagos ativados se espalham e cobrem as fibras da matriz dérmica.

Na fase III, de 10 a 14 dias, ocorre a formação de tecido de granulação, com a presença de fibroblastos, macrófagos, linfócitos e neovascularização, com surgimento de células endoteliais.

De 15 a 17 dias, tem-se a fase IV, em que há predomínio de fibroblastos metabolicamente ativos, com núcleo aumentado e deposição de colágeno ativo e formação de

canais vasculares²⁰.

Durante a fase V, de 18 a 25 dias, o colágeno é predominante e preenche toda a pele artificial. Fibroblastos são evidentes e as fibras da matriz dérmica ainda são visíveis.

Após 30 dias, tem-se a fase VI, quando desaparecem as fibras da matriz. Nesta fase ocorre a regeneração completa das camadas de pele e a divisão entre derme papilar e reticular reaparece²⁰.

Os substitutos de pele, tanto epidérmicos quanto dérmicos, parecem ser uma nova e promissora alternativa no tratamento das queimaduras, na fase aguda como também na remoção de seqüelas. Estas estruturas procuram reconstituir morfológica e funcionalmente a pele normal.

2. OBJETIVO

Desenvolver um estudo experimental em ratos, que possibilite uma análise histológica detalhada do processo de integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo.

3. MÉTODO

4.1 – Amostra

Foram utilizados 30 ratos albinos, da linhagem Wistar-EPM1 (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Mammalia), com idade em torno de 180 dias e peso variando de 250 a 300 gramas, adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram ambientados no Biotério Central da UNESC, sete dias antes do início do implante de matriz dérmica, em ambiente controlado, recebendo água e ração padronizada².

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos:

Grupo 1 – Implante de Matriz Dérmica

Grupo 2 – Enxerto Autólogo

Grupo 3 – Cicatrização por Contração

4.2 – Procedimentos

Foi realizado um estudo experimental, randomizado e prospectivo, submetido ao Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob n°. 0051.

Todos os animais permaneceram em jejum **24** horas antes do implante de matriz dérmica, recebendo apenas água destilada *ad libitum*.

Inicialmente, os animais foram submetidos à anestesia, com administração de 0,1 ml para cada 100 gramas de peso corporal de quetamina³ + xilasina⁴ na proporção de 60 mg: 10 mg, respectivamente, por via intramuscular, na face interna da pata traseira do animal. O animal foi considerado anestesiado quando houve perda do reflexo córneo-palpebral e ausência de qualquer reação motora, pela prensão do coxim adiposo da pata dianteira.

Em todos os animais foi feita tricotomia e anti-sepsia da região dorsal, utilizando solução alcoólica iodada (Figura 2). Após, foi realizada a excisão de um quadrado profundo

² Nuvilab CR1, Colombo, PR.

³ Ketalar, Parker-Davis, Guarulhos, SP

⁴ Rompum, Bayer, Porto Alegre, RS

de pele, da região dorsal localizada entre os membros dianteiros e traseiros do animal, medindo 4 cm², deixando exposta a fáscia muscular (Figura 3).

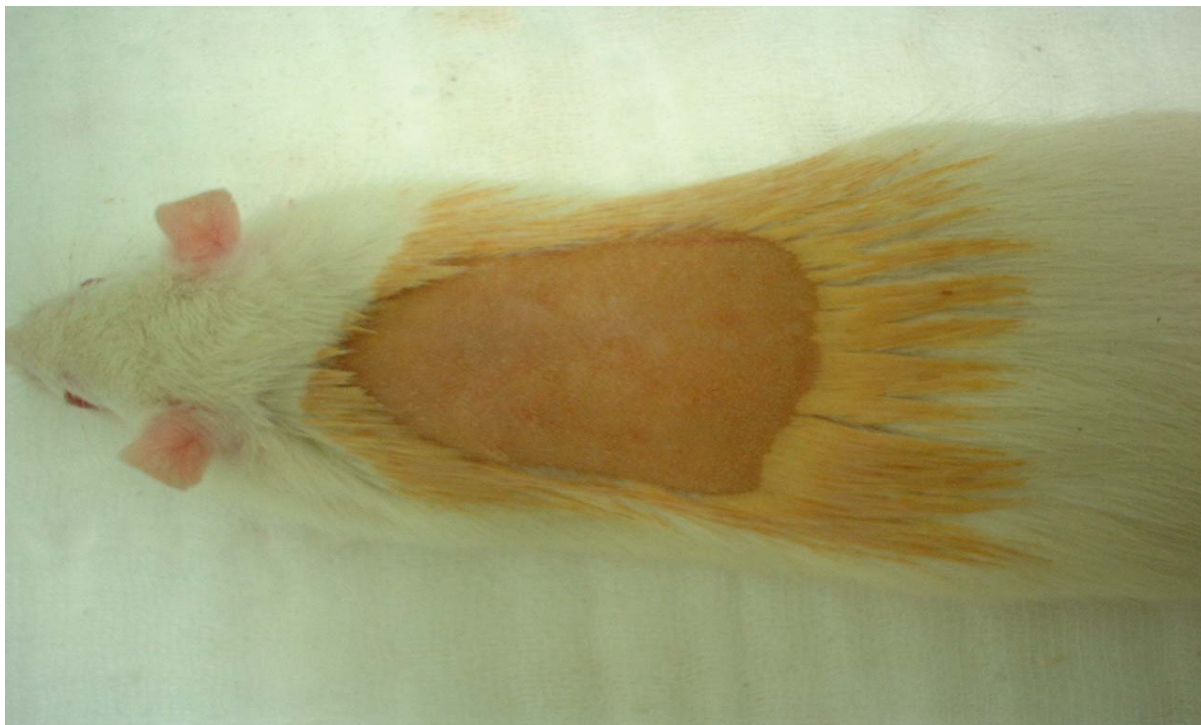


Figura 2 – Fotografia mostrando a tricotomia e a anti-sepsia com solução alcoólica iodada realizada em todos os animais.



Figura 3 – Fotografia de um rato onde se retirou um retalho de pele da região dorsal, deixando exposta a fáscia muscular.

A matriz dérmica Integra foi retirada do meio contendo álcool isopropílico a 70% e colocada em um recipiente esterilizado contendo 2 litros de soro fisiológico 0,9%, onde permaneceu por 2 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, em recipientes separados, apresentando a mesma quantidade de soro fisiológico e pelo mesmo tempo.

Nos animais do Grupo Implante de Matriz Dérmica, aplicou-se um enxerto de matriz dérmica do tamanho da ferida cirúrgica, de modo a cobri-la totalmente. Com fio mono filamentado de náilon 4-0, foi feita a sutura das bordas da matriz à pele do animal, utilizando-se 8 pontos simples separados (Figura 4).

Nos animais do Grupo Enxerto Autólogo, foi aplicado um enxerto autólogo convencional de pele sobre a ferida, que também foi fixado à pele, com 8 pontos separados de fio mono filamentado de náilon 4-0 (Figura 5).

Nos animais do Grupo Cicatrização por Contração, aguardou-se a cicatrização espontânea da ferida cirúrgica (Figura 6).



Figura 4 - Fotografia mostrando um animal do Grupo Implante de Matriz Dérmica, no qual aplicou-se o enxerto de matriz de regeneração dérmica cobrindo todo o leito da ferida.



Figura 5 - Fotografia mostrando um animal do Grupo Enxerto Autólogo, no qual aplicou-se um enxerto autólogo convencional de pele.



Figura 6 - Fotografia mostrando um animal do Grupo Cicatrização por Contração, no qual se aguardou a cicatrização espontânea.

No pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas, em grupos de cinco, recebendo água e ração *Ad Libidum*.

Com 7 e 14 dias, os animais de cada um dos 3 grupos foram anestesiados pela mesma técnica e submetidos à biópsia da área cirúrgica, com a retirada de um fragmento, contendo um dos ângulos da ferida cirúrgica e da pele sadia, com extensão de aproximadamente 0,5 cm para cada lado. Aos 7 dias, a biópsia foi realizada no lado relacionado ao membro traseiro esquerdo do animal, e aos 14 dias, no lado relacionado ao membro traseiro direito do animal.

Com 21 dias, os animais de cada um dos 3 grupos foram novamente anestesiados pela mesma técnica e submetidos à biópsia excisional, com retirada da metade da ferida cirúrgica relacionada aos membros dianteiros do animal. Após a última biópsia, foi realizada a eutanásia dos animais, com exsanguinamento pela veia jugular, até a parada cardíaco-respiratória.

A avaliação da cicatrização e da integração da matriz dérmica foi realizada com biópsias no 7º, 14º e 21º dia, porém a análise dos dados restringiu-se aos grupos no 21º dia uma vez que neste período é que se completa o processo de formação da neoderme e da cicatrização.

O material retirado nas biópsias foi colocado em solução de formalina a 10% na temperatura ambiente, em frascos devidamente individualizados e catalogados, e encaminhados para exame histo-patológico no Laboratório de Anatomia Patológica Rocha, na cidade de Criciúma/SC.

A interpretação histológica foi realizada em cada amostra, especificando o animal e o dia da biópsia. O acompanhamento das observações foi feito da maneira habitual, semiquantitativa, analisando a quantidade de infiltração celular (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes), a formação de neoderme (neovascularização, deposição de colágeno e neoformação dérmica) e a formação de fibrose (presença de fibroblastos e retração fibro-cicatricial).

Os enxertos teciduais foram descritos macroscopicamente e, depois, seccionados de maneira a representar a transição do bordo íntegro, com a ferida operatória. Os fragmentos selecionados para inclusão foram identificados conforme o frasco correspondente indicava. As informações de identificação consistiam do número individual do rato (1 a 10), do grupo a que pertenciam (E - Grupo Implante de Matriz Dérmica; C - Grupo Enxerto Autólogo; S - Grupo Cicatrização por Contração) e do tempo de evolução pós-procedimento

(7, 14 e 21 dias).

De cada frasco foram incluídos 1 ou 2 fragmentos representativos da biópsia. O material foi processado por um Processador Tecidual Automático (Autotechnican Duo, modelo 2A) e resultou num total de 90 blocos de parafina. Estes blocos foram seccionados por micrótomo de parafina com cortes de 5 μm , montados em lâminas de vidro e corados pelo método rotineiro de Hematoxilina-Eosina (HE).

Estas 90 lâminas foram examinadas por microscopia ótica. No sentido de acompanhar o processo reparativo-cicatricial, de uma maneira dinâmica e objetiva, que permitisse uma comparação entre os grupos e o tempo de evolução, foram criados 10 parâmetros microscópicos. Estes parâmetros foram pesquisados individualmente em cada lâmina e classificados quantitativamente da seguinte forma: 0-ausência; 1-leve/escasso; 2-moderado; 3-acentuado/numerosos.

Os dados coletados foram digitados utilizando o programa Excel e, a seguir, exportados para o programa SPSS 8.0 para obtenção das medidas descritivas.

As medidas relativas às variáveis independentes de interesse, são apresentadas usando a média e a mediana, uma vez que às características destas medidas (escores) infringiam princípios básicos para a utilização do teste paramétrico (ANOVA), ou seja, homogeneidade das variâncias, normalidade da distribuição e escala pelo menos intervalar. O teste de Kruskal Wallis (ANOVA on Ranks) foi então empregado na comparação de três amostras independentes, com o objetivo de investigar a existência de uma diferença estatisticamente significativa, ao comparar a mediana nos três grupos ($p < 0.05$). Neste estágio da análise, foi utilizado programa Sigmastat 3.0.

5. RESULTADOS

TABELA 1 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 7 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
1	E1	7	2	2	0	1	0
2	E2	7	2	1	0	2	0
3	E3	7	2	2	0	1	0
4	E4	7	1	2	0	1	0
5	E5	7	2	2	0	2	0
6	E6	7	1	1	0	2	0
7	E7	7	1	2	0	1	0
8	E8	7	1	2	0	1	1
9	E9	7	1	2	0	2	0
10	E10	7	1	1	0	1	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 2 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 7 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
11	C1	7	1	3	0	1	0
12	C2	7	1	3	0	1	0
13	C3	7	1	3	0	1	0
14	C4	7	1	1	0	1	0
15	C5	7	1	2	0	1	0
16	C6	7	1	3	0	1	0
17	C7	7	1	2	0	1	0
18	C8	7	1	3	0	1	1
19	C9	7	1	2	0	1	0
20	C10	7	1	1	0	1	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 3 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 7 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
21	S1	7	1	3	0	1	0
22	S2	7	1	3	0	1	0
23	S3	7	1	2	0	1	1
24	S4	7	1	3	0	1	1
25	S5	7	1	2	0	1	0
26	S6	7	1	2	0	1	2
27	S7	7	1	1	0	1	2
28	S8	7	1	2	0	1	2
29	S9	7	1	2	0	1	2
30	S10	7					

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 4 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 14 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
1	E1	14	1	2	0	0	0
2	E2	14	1	1	0	0	0
3	E3	14	1	2	0	0	0
4	E4	14	1	2	0	0	0
5	E5	14	1	1	0	0	0
6	E6	14	1	1	0	0	0
7	E7	14	1	1	0	0	0
8	E8	14	1	2	0	1	1
9	E9	14	1	1	0	0	0
10	E10	14	1	1	0	0	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 5 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 14 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
11	C1	14	1	2	0	1	2
12	C2	14	2	2	0	1	3
13	C3	14	2	2	0	1	2
14	C4	14	2	2	0	1	2
15	C5	14	1	1	0	1	1
16	C6	14	1	2	0	1	1
17	C7	14	1	1	0	1	1
18	C8	14	1	2	0	1	1
19	C9	14	1	3	0	1	2
20	C10	14	2	2	0	1	2

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 6 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 14 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
21	S1	14	1	1	0	1	0
22	S2	14	2	1	0	1	0
23	S3	14	1	1	0	0	0
24	S4	14	1	2	0	1	0
25	S5	14	1	1	0	1	0
26	S6	14	1	2	0	1	1
27	S7	14	1	2	0	1	1
28	S8	14	1	1	0	1	0
29	S9	14	1	1	0	1	0
30	S10	14	1	2	0	1	2

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso32

TABELA 7 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 21 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
1	E1	21	1	1	0	0	0
2	E2	21	1	1	0	1	1
3	E3	21	1	2	0	1	1
4	E4	21	1	2	0	1	0
5	E5	21	1	1	0	1	1
6	E6	21	1	2	0	1	0
7	E7	21	1	2	0	1	0
8	E8	21	1	1	0	1	1
9	E9	21	1	2	0	1	2
10	E10	21	1	1	0	1	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

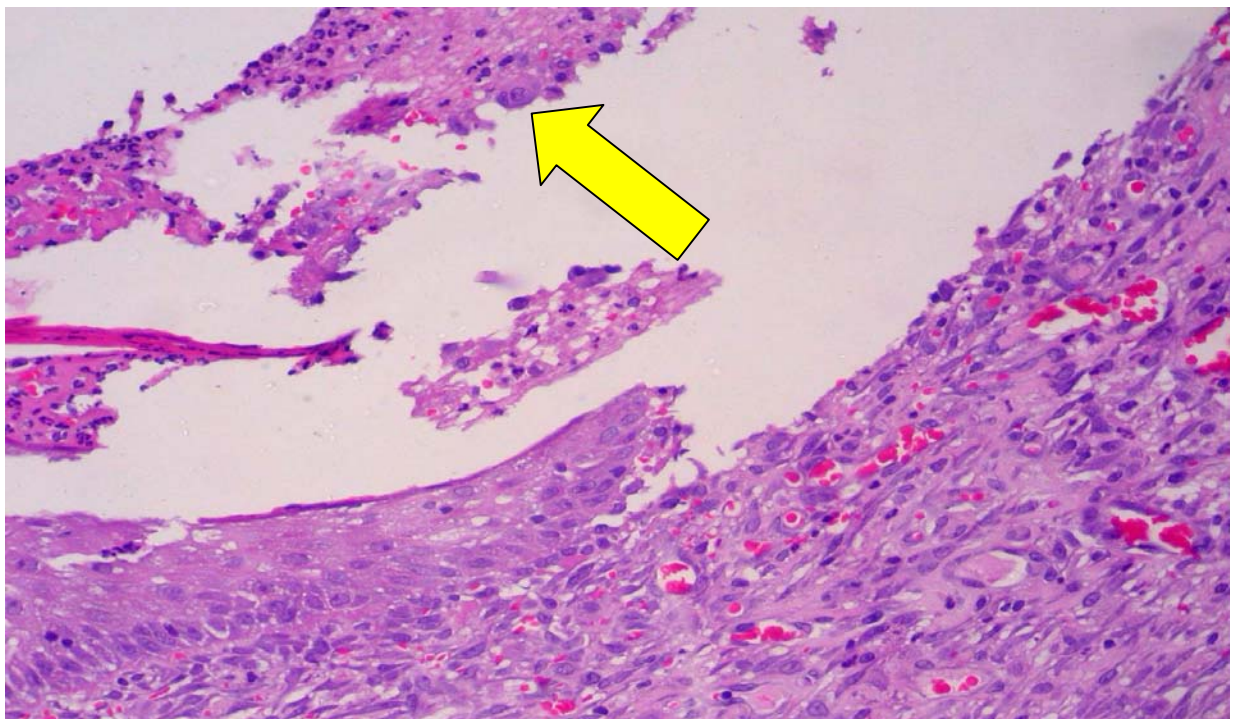


Figura 7 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Implante de Matriz Dérmica com 21 dias mostrando a presença de neutrófilos.

TABELA 8 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 21 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
11	C1	21	1	1	0	0	0
12	C2	21	1	1	0	1	1
13	C3	21	1	2	0	0	0
14	C4	21	1	2	0	1	1
15	C5	21	1	1	0	1	0
16	C6	21	1	2	0	1	0
17	C7	21	1	2	0	1	1
18	C8	21	1	1	0	1	0
19	C9	21	2	2	0	1	0
20	C10	21	1	1	0	0	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

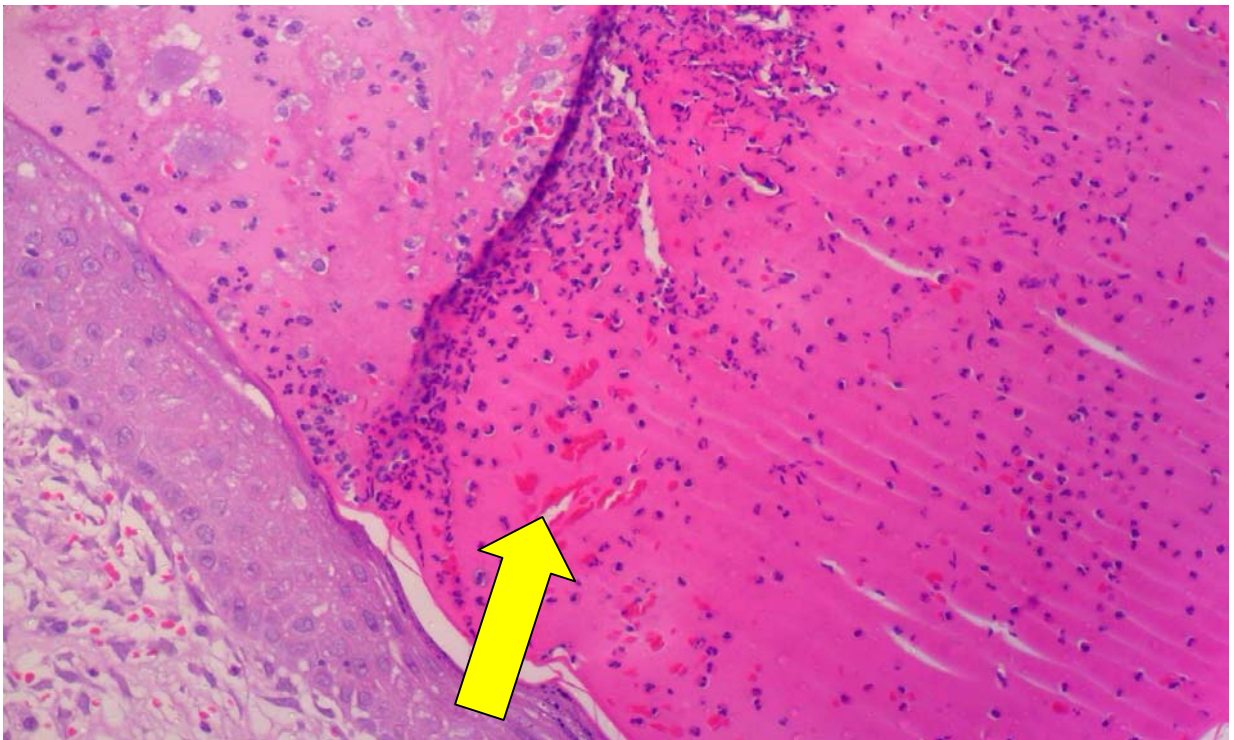


Figura 8 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Enxerto Autólogo com 21 dias mostrando a presença de neutrófilos.

TABELA 9 - Achados histológicos relacionados ao processo inflamatório no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 21 dias

Rato	Grupo	Tempo	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo	Macrófago	C.Gigante
21	S1	21	1	2	0	0	0
22	S2	21	1	2	0	0	0
23	S3	21	1	2	0	1	1
24	S4	21	1	2	0	1	1
25	S5	21	2	3	0	1	1
26	S6	21	1	2	0	1	0
27	S7	21	1	2	0	1	1
28	S8	21	1	2	0	1	0
29	S9	21	1	2	0	1	0
30	S10	21	2	2	0	1	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

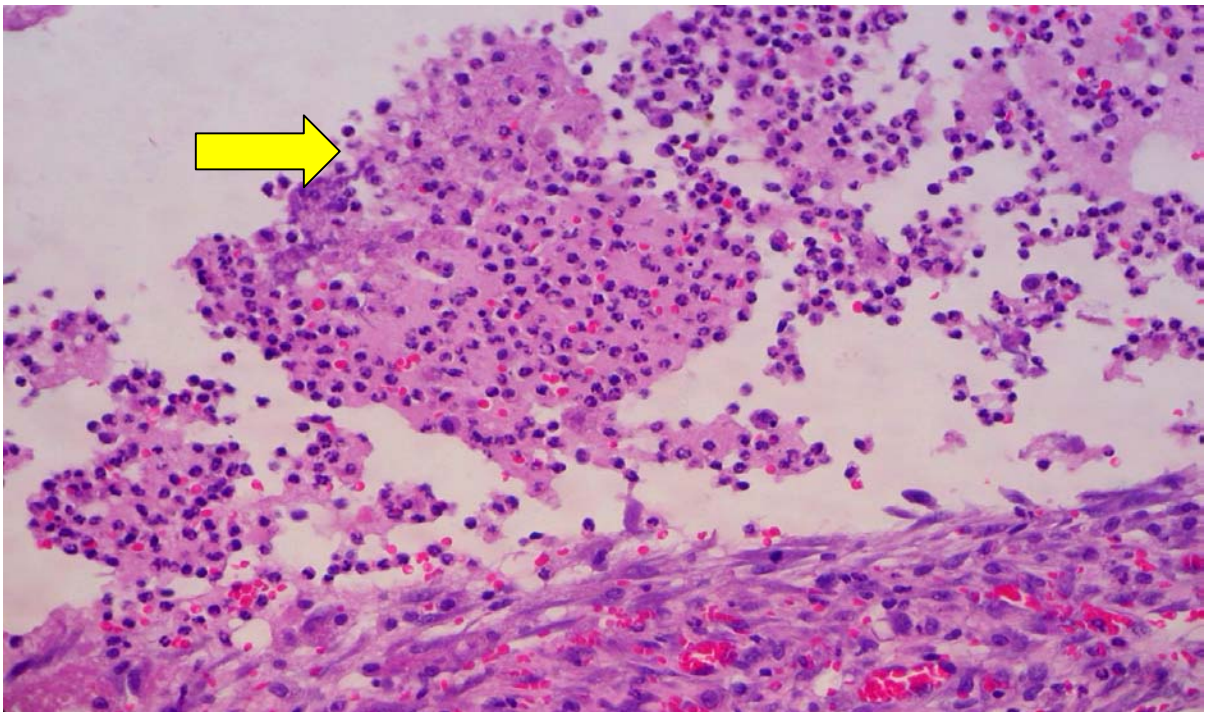


Figura 9- Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Cicatrização por Contração com 21 dias mostrando a intensa presença de neutrófilos.

TABELA 10 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 7 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
1	E1	7	3	1	1	1
2	E2	7	2	1	1	1
3	E3	7	2	1	1	1
4	E4	7	3	1	1	0
5	E5	7	2	1	1	1
6	E6	7	2	1	1	1
7	E7	7	2	0	1	0
8	E8	7	2	1	1	1
9	E9	7	3	1	1	1
10	E10	7	2	1	1	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 11 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 7 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
11	C1	7	1	0	1	0
12	C2	7	0	0	0	0
13	C3	7	1	1	2	0
14	C4	7	1	0	1	0
15	C5	7	1	0	1	0
16	C6	7	1	0	1	0
17	C7	7	0	0	0	0
18	C8	7	0	0	0	0
19	C9	7	1	0	0	0
20	C10	7	1	1	1	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 12 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 7 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
21	S1	7	1	0	0	0
22	S2	7	1	0	1	0
23	S3	7	1	0	2	0
24	S4	7	1	0	1	0
25	S5	7	1	0	1	0
26	S6	7	2	0	2	0
27	S7	7	1	0	1	0
28	S8	7	1	0	1	0
29	S9	7	2	0	1	0
30	S10	7				

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 13 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 14 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
1	E1	14	3	2	2	2
2	E2	14	3	2	2	2
3	E3	14	2	2	2	2
4	E4	14	2	2	2	2
5	E5	14	2	2	1	2
6	E6	14	2	2	2	2
7	E7	14	2	2	2	2
8	E8	14	2	2	1	2
9	E9	14	3	2	2	2
10	E10	14	2	2	1	2

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 14 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 14 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
11	C1	14	1	1	2	0
12	C2	14	1	1	2	1
13	C3	14	1	1	1	1
14	C4	14	1	1	1	1
15	C5	14	1	1	2	1
16	C6	14	0	0	1	0
17	C7	14	1	1	2	1
18	C8	14	1	1	2	1
19	C9	14	1	1	1	1
20	C10	14	1	1	1	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 15 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 14 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
021	S1	14	2	1	2	1
22	S2	14	2	1	1	1
23	S3	14	1	1	1	0
24	S4	14	1	1	1	0
25	S5	14	1	1	1	0
26	S6	14	2	1	2	0
27	S7	14	2	1	1	0
28	S8	14	1	1	1	1
29	S9	14	1	1	1	1
30	S10	14	1	1	2	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 16 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 21 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascularização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
1	E1	21	1	2	2	2
2	E2	21	1	2	2	2
3	E3	21	2	2	2	1
4	E4	21	2	2	2	2
5	E5	21	1	2	2	2
6	E6	21	2	2	2	2
7	E7	21	1	2	2	1
8	E8	21	2	2	2	2
9	E9	21	2	2	2	2
10	E10	21	2	1	2	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

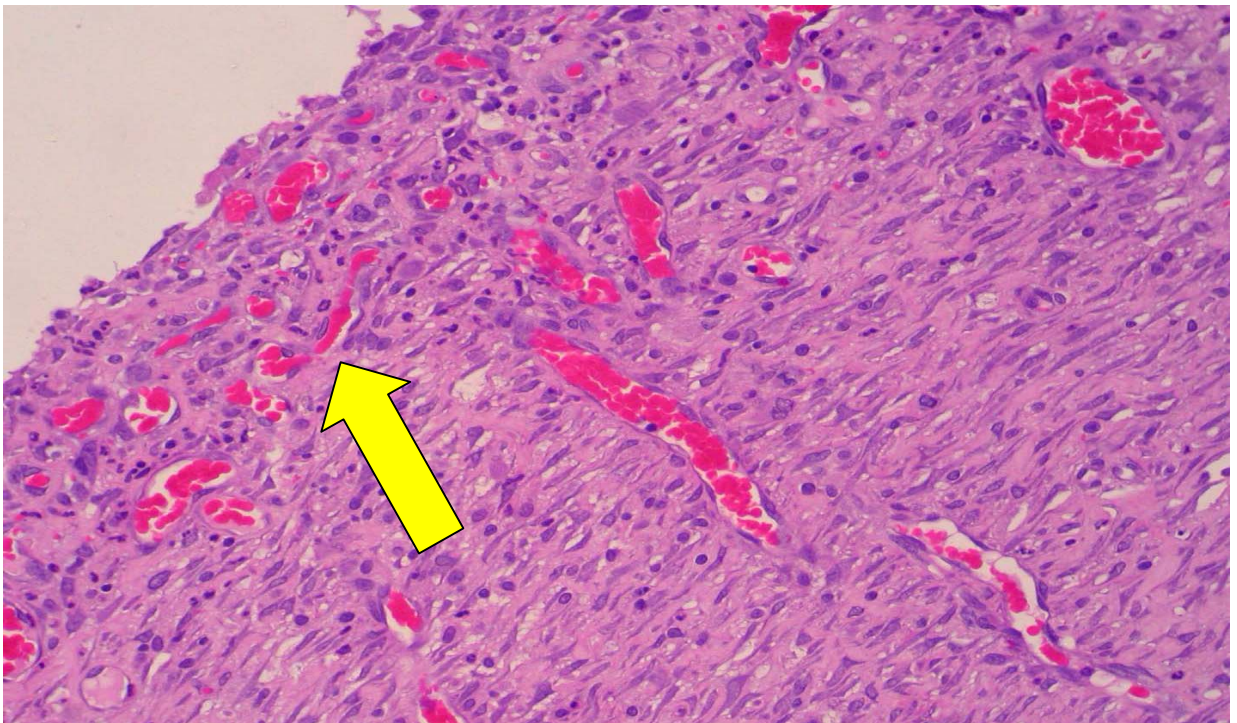


Figura 10 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Implante de Matriz Dérmica com 21 dias, mostrando a neovascularização.

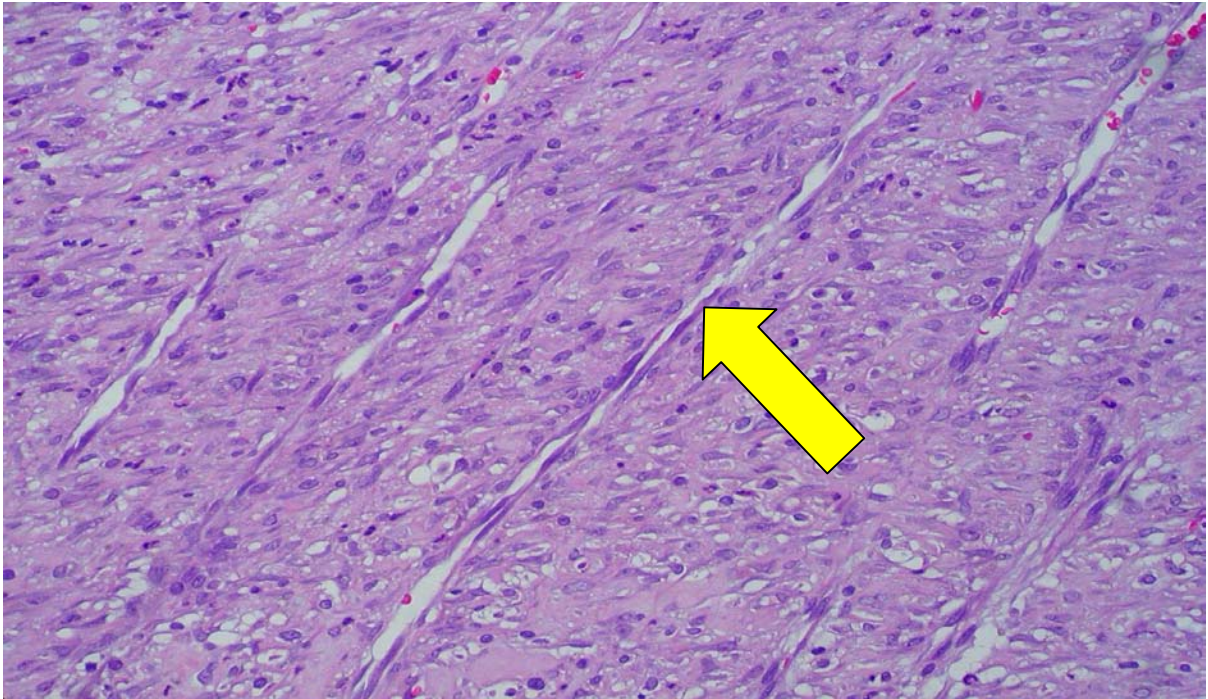


Figura 11 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Implante de Matriz Dérmica com 21 dias, mostrando a formação de canais vasculares.

TABELA 17 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 21 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascularização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
11	C1	21	2	1	2	1
12	C2	21	2	2	2	2
13	C3	21	1	2	1	1
14	C4	21	2	2	2	0
15	C5	21	1	2	2	1
16	C6	21	2	1	2	1
17	C7	21	2	2	2	1
18	C8	21	1	2	2	1
19	C9	21	2	1	2	1
20	C10	21	1	2	2	2

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

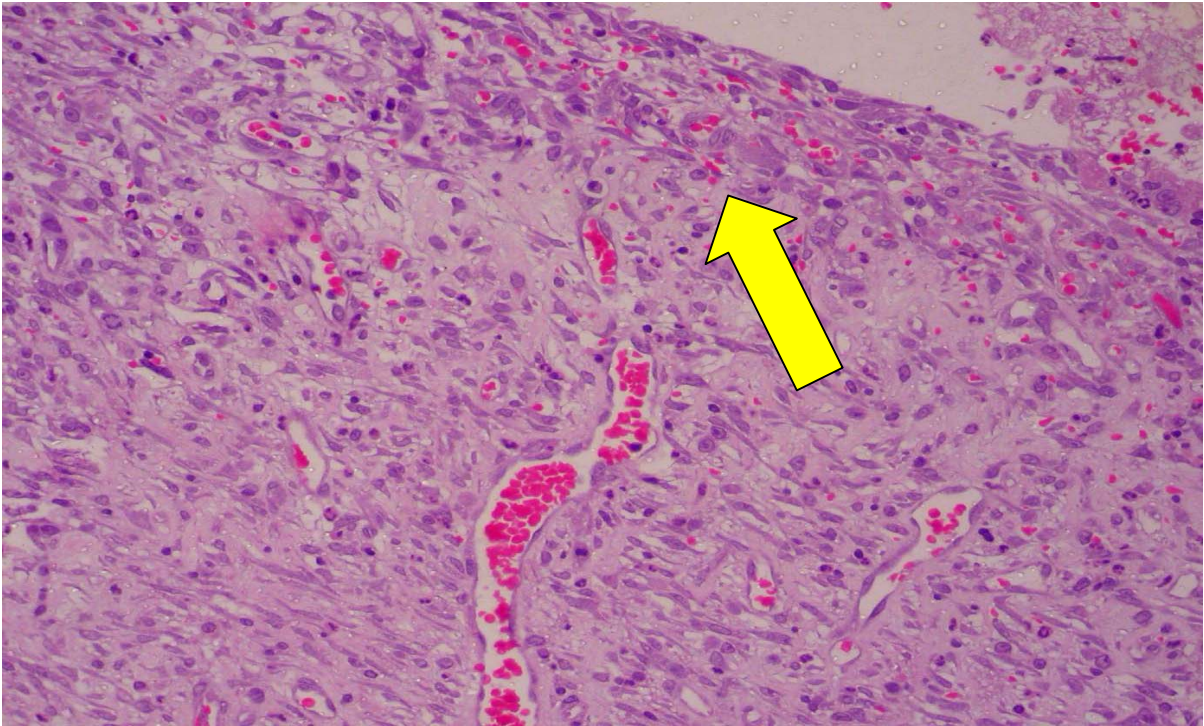


Figura 12 – Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Enxerto Autólogo com 21 dias mostrando a neovascularização.

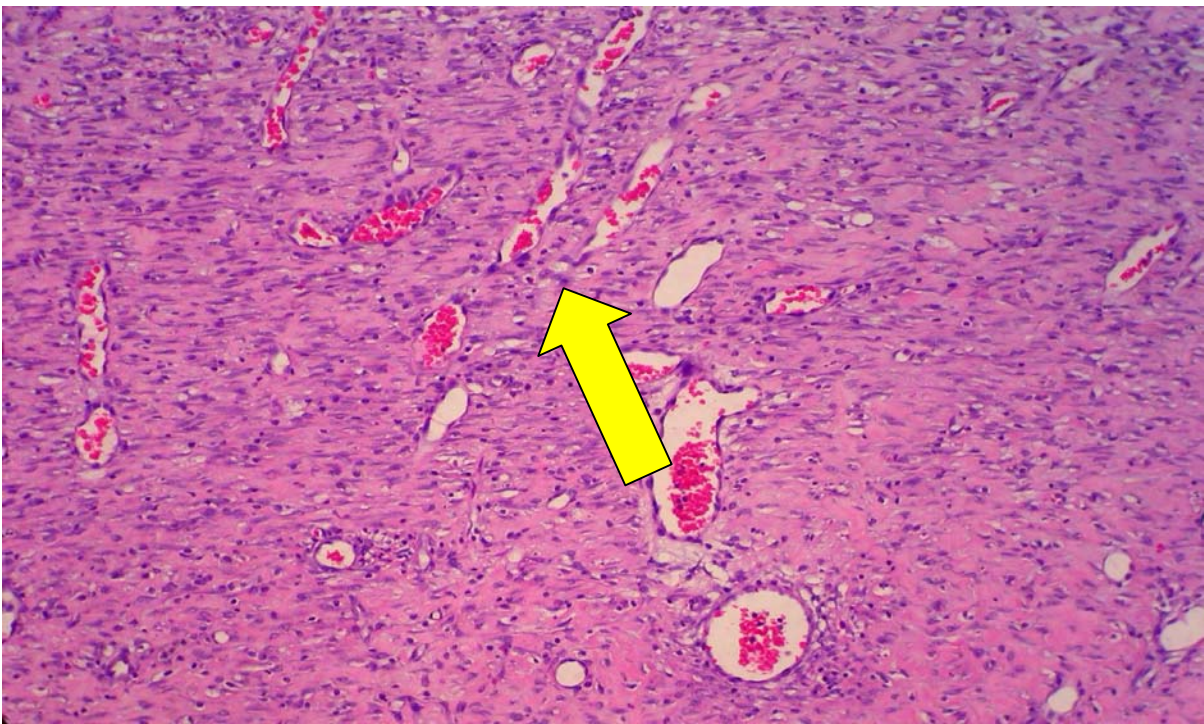


Figura 13 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Enxerto Autólogo com 21 dias, mostrando a formação de canais vasculares.

TABELA 18 - Achados histológicos relacionados à formação de neoderme no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 21 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Neovascu- rização	Neoformação Dérmica	Depósito de Colágeno	Canais vasculares
21	S1	21	1	1	2	0
22	S2	21	1	1	2	0
23	S3	21	2	1	1	0
24	S4	21	1	1	1	0
25	S5	21	2	1	1	0
26	S6	21	1	1	2	0
27	S7	21	1	1	1	0
28	S8	21	1	1	2	0
29	S9	21	2	1	2	0
30	S10	21	2	1	2	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

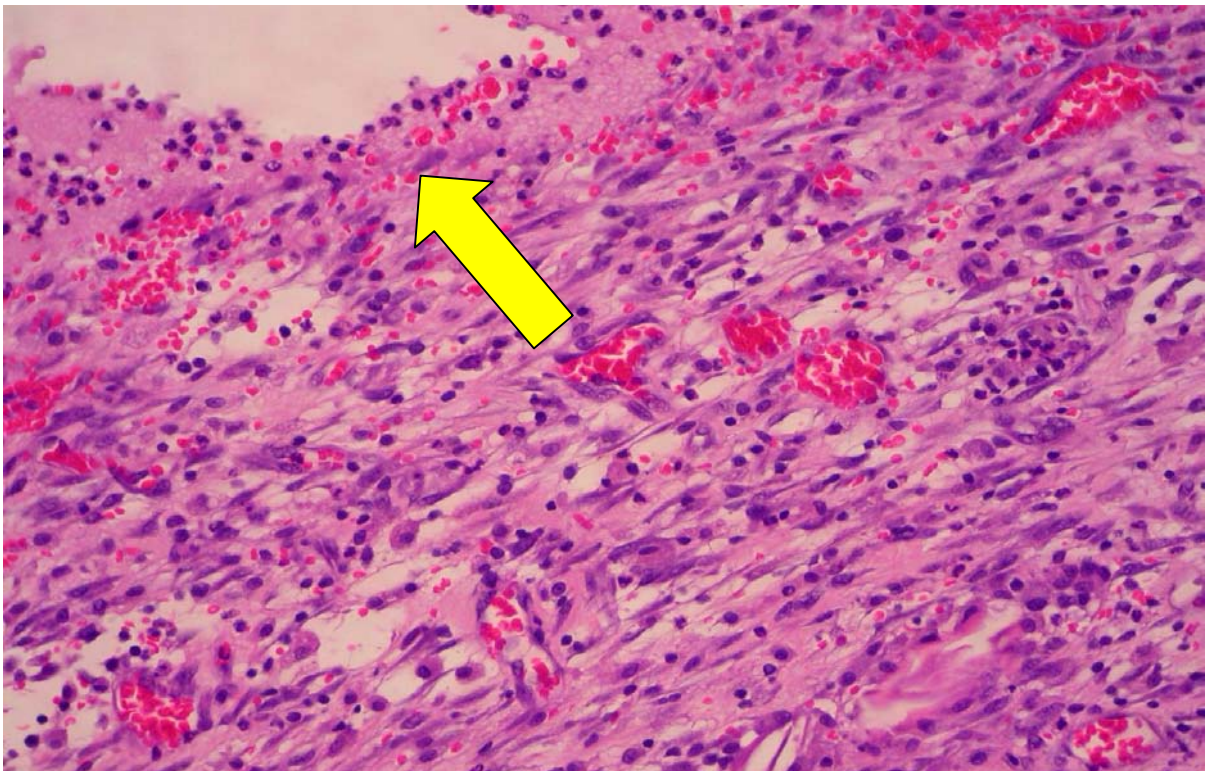


Figura 14 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Cicatrização por Contração com 21 dias, mostrando a neovascularização.

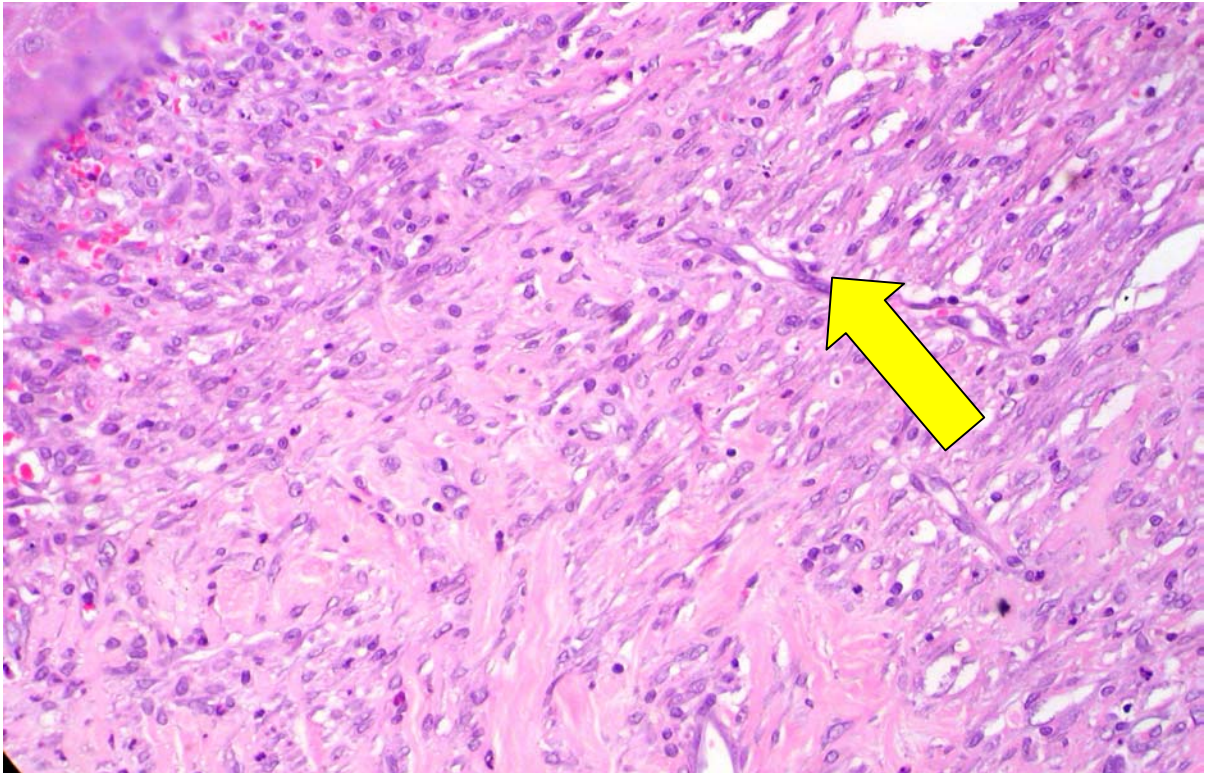


Figura 15 – Fotomicrografia de uma lâmina de um animal rato do Grupo Cicatrização por Contração com 21 dias, mostrando a ausência de formação de canais vasculares.

TABELA 19 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 7 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
1	E1	7	2	0
2	E2	7	2	0
3	E3	7	2	0
4	E4	7	2	0
5	E5	7	2	0
6	E6	7	2	0
7	E7	7	2	0
8	E8	7	2	0
9	E9	7	2	0
10	E10	7	2	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 20 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 7 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
11	C1	7	1	0
12	C2	7	0	0
13	C3	7	2	0
14	C4	7	1	0
15	C5	7	1	0
16	C6	7	1	0
17	C7	7	1	0
18	C8	7	1	0
19	C9	7	1	0
20	C10	7	2	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 21 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 7 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
21	S1	7	1	0
22	S2	7	2	0
23	S3	7	2	0
24	S4	7	2	0
25	S5	7	3	0
26	S6	7	3	0
27	S7	7	2	0
28	S8	7	3	0
29	S9	7	3	0
30	S10	7		

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 22 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 14 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
1	E1	14	1	0
2	E2	14	1	0
3	E3	14	1	0
4	E4	14	2	0
5	E5	14	1	0
6	E6	14	1	1
7	E7	14	2	0
8	E8	14	1	0
9	E9	14	1	0
10	E10	14	1	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 23 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 14 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
11	C1	14	1	0
12	C2	14	2	1
13	C3	14	2	0
14	C4	14	2	0
15	C5	14	2	0
16	C6	14	1	0
17	C7	14	2	1
18	C8	14	2	0
19	C9	14	2	0
20	C10	14	2	0

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 24 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 14 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
21	S1	14	2	1
22	S2	14	2	1
23	S3	14	3	1
24	S4	14	3	1
25	S5	14	3	1
26	S6	14	3	1
27	S7	14	3	1
28	S8	14	2	1
29	S9	14	2	1
30	S10	14	3	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

TABELA 25 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Implante de Matriz Dérmica (E) com 21 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
1	E1	21	1	1
2	E2	21	2	0
3	E3	21	2	0
4	E4	21	1	0
5	E5	21	1	1
6	E6	21	2	1
7	E7	21	2	1
8	E8	21	2	1
9	E9	21	2	1
10	E10	21	2	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

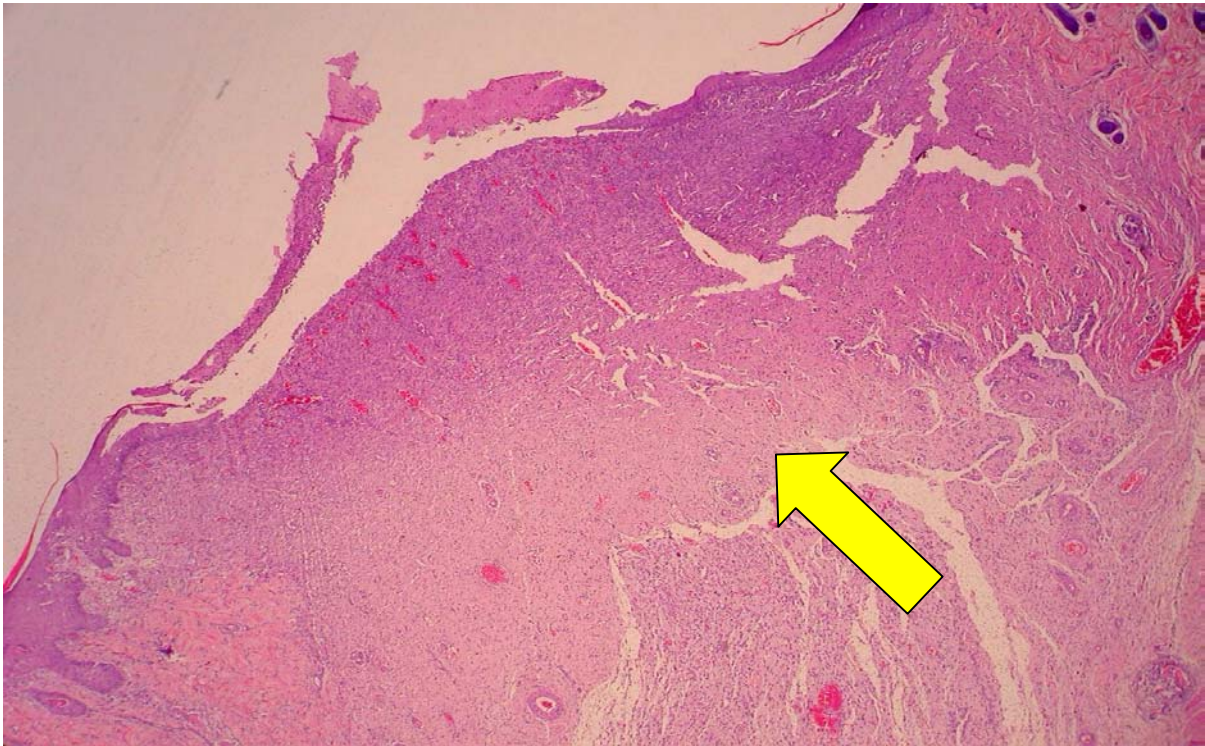


Figura 16 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Implante de Matriz Dérmica com 21 dias, mostrando uma intensa neoformação dérmica e pouca retração fibro-cicatricial.

TABELA 26 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Enxerto Autólogo (C) com 21 dias

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
11	C1	21	2	1
12	C2	21	2	1
13	C3	21	2	1
14	C4	21	2	1
15	C5	21	1	1
16	C6	21	1	1
17	C7	21	2	1
18	C8	21	2	1
19	C9	21	1	1
20	C10	21	2	1

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso

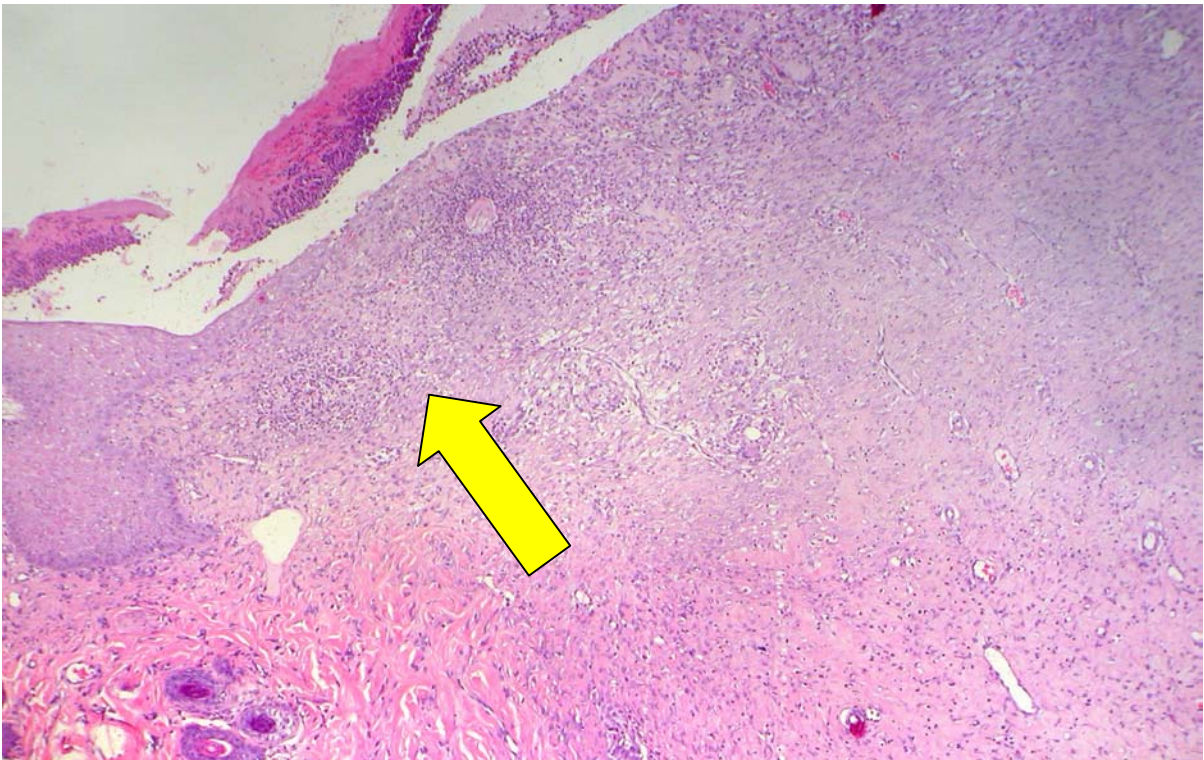


Figura 17 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Enxerto Autólogo, com 21 dias, mostrando a neoformação dérmica e a cicatrização fibro-cicatricial.

TABELA 27 - Achados histológicos relacionados à formação de fibrose no Grupo Cicatrização por Contração (S) com 21 dias.

Rato	Grupo	Tempo	Fibroblasto	Retração
			Ativo	fibrocicatricial
21	S1	21	1	2
22	S2	21	2	3
23	S3	21	2	2
24	S4	21	1	2
25	S5	21	2	2
26	S6	21	1	2
27	S7	21	1	2
28	S8	21	2	1
29	S9	21	3	2
30	S10	21	3	2

0-ausente 1-escasso 2-moderado 3-intenso



Figura 18 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Cicatrização por Contração com 21 dias, mostrando a neoformação dérmica e a retração fibro-cicatricial

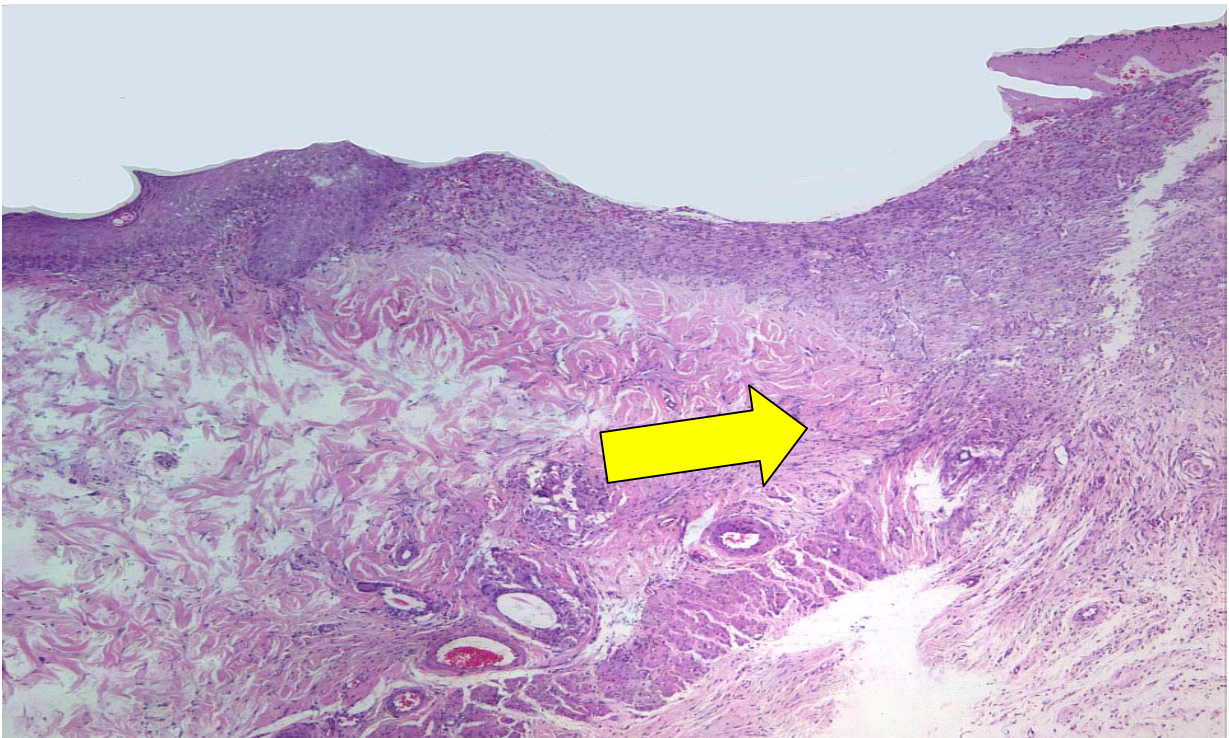


Figura 19 - Fotomicrografia de uma lâmina de um animal do Grupo Cicatrização por Contração, com 21 dias, onde a nova derme é delgada e a retração fibro-cicatricial é maior. Percebe-se a aproximação do tecido muscular à superfície da ferida.

6. DISCUSSÃO

Em casos de grandes perdas de pele, onde fica impossível fazer a cobertura das lesões com enxerto autólogo, há necessidade do uso de outras coberturas permanentes que se integrem ao organismo e criem as características mais semelhantes possíveis à pele original. Para realizar essas coberturas, contamos, na atualidade, com poucos produtos disponíveis no mercado, uma vez que a maioria das coberturas utilizadas atualmente, como pele humana de banco de tecidos, pele porcina ou pele de rã, constituem-se em coberturas temporárias.

Um adequado substituto da pele deve incorporar muito das qualidades básicas da derme e epiderme^{1,25}:

- Aderência
- Perda de água controlada
- Elasticidade
- Durabilidade
- Ser uma barreira bacteriana
- Atóxica e não antigênica
- Anti-séptica
- Hemostática
- De fácil aplicação e remoção
- Relativamente de baixo custo.

Atualmente, as matrizes com base de colágeno mimetizando a estrutura bi-laminar da pele têm tido aplicação clínica cada vez mais freqüente¹³.

Para analisar a integração dessas matrizes, foi realizado o presente estudo, procurando acompanhar a formação da neoderme conforme o tempo de evolução recomendado pela literatura^{7,8,13,14,17}. Para tanto, foram feitas biópsias seriadas com 7, 14 e 21 dias, em matrizes dérmicas implantadas no dorso de ratos Wistar, que foram eficientes para observar a evolução da integração do produto ao organismo, nas diferentes fases, comparando os resultados do Grupo Implante de Matriz Dérmica, onde se implantou a matriz de regeneração dérmica, com o Grupo Enxerto Autólogo, onde se aplicou um enxerto autólogo de pele, e o Grupo Cicatrização por Contração, onde se aguardou a cicatrização espontânea da ferida cirúrgica.

Os parâmetros analisados estavam relacionados ao processo inflamatório (presença de

linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e células gigantes), à formação de neoderme (neovascularização, deposição de colágeno e neoformação dérmica) e à formação de fibrose (presença de fibroblastos e retração cicatricial), uma vez que eles refletem a progressão do processo de cicatrização e integração da matriz ao organismo^{1,4,7,8}.

Analisando a resposta inflamatória nos três grupos estudados, observou-se que com 7 dias houve um aumento mais intenso do número de linfócitos e macrófagos no Grupo Implante de Matriz Dérmica. Este achado é corroborado por diversos autores que descrevem neste período, a invasão da matriz dérmica por células inflamatórias para posterior síntese de colágeno²² (tabelas 1, 2 e 3).

O perfil da resposta inflamatória aos 14 dias, foi caracterizado por um aumento de linfócitos, macrófagos e células gigantes no Grupo Enxerto Autólogo. Por outro lado, no Grupo Implante de Matriz Dérmica houve diminuição do número de linfócitos e macrófagos em relação ao período anterior. Este fato parece estar relacionado à degradação progressiva da matriz dérmica com menos células fagocitárias (tabelas 4, 5 e 6).

Quanto à resposta inflamatória com 21 dias (tabelas 7, 8 e 9) foi analisada a presença de linfócitos neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes. Apenas a presença de neutrófilos, foi estatisticamente significativa, com $p < 0,05$. Na média, o Grupo Cicatrização por Contração foi o que teve a maior incidência de neutrófilos (Figura 9). Não foi encontrada diferença entre o Grupo Implante de Matriz Dérmica (Figura 7) e o Grupo Enxerto Autólogo (Figura 8).

Os neutrófilos são células inflamatórias, que nos processos de cicatrização surgem no local dentro de 24 horas. Por volta do 3º. dia, eles são substituídos por macrófagos quase na sua totalidade. Nos casos de cicatrização primária, com 21 dias, espera-se encontrar um tecido conjuntivo isento de processo inflamatório. No entanto, nos grandes defeitos teciduais, em que não é feita uma cobertura dérmica durante o processo cicatricial, uma quantidade maior de fibrina e de restos necróticos e exsudato necessita ser removida, mantendo essas células em atividade. Conseqüentemente, a reação inflamatória é mais intensa⁵.

Corroborando as informações da literatura, no Grupo Cicatrização por Contração, sem cobertura dérmica, o processo inflamatório, conseqüentemente, foi mais intenso e, talvez, por isso, se tenha encontrado maior número de neutrófilos no 21º dia. Contudo, não se esperava a presença de células inflamatórias nos Grupo Implante de Matriz Dérmica e Enxerto Autólogo, embora se tenha encontrado em pequena quantidade. Provavelmente, houve algum processo

infecioso associado durante a fase de cicatrização, que persistiu mesmo após 21 dias, já que foram realizadas biópsias semanais, não foram utilizados curativos oclusivos e a camada de silicone que cobre a matriz dérmica se perdeu durante as 3 semanas, em grande parte dos animais.

Em relação aos eosinófilos, eles estavam ausentes em todas as amostras e em todos os períodos (Tabelas 1 a 9). Stern e colegas encontraram a presença de até 12,2 % de eosinófilos em biópsia de uma série de 131 pacientes nos quais foi implantada a matriz dérmica⁷. Considerando que o aumento dessas células é esperado, somente, em casos de reações imunes mediadas por imunoglobulinas E e em doenças parasitárias⁵, a ausência dessas células nos três grupos estudados era esperada, embora discordante de alguns autores.

A presença de linfócitos, em média, foi maior no Grupo Cicatrização por Contração, decrescendo para o Grupo Enxerto Autólogo e Implante de Matriz Dérmica. Todavia, não teve significância estatística. Levando em conta que essas células são mobilizadas, tanto nas reações imunológicas mediadas por células, quanto naquelas mediadas por anticorpos e, ainda, por motivos desconhecidos na inflamação isenta de mediação neurológica, e que estas células apresentam uma relação de reciprocidade com os macrófagos na inflamação crônica⁵, sua presença no Grupo Cicatrização por Contração também era esperada, embora sem significância estatística.

Macrófagos e células gigantes estavam presentes nos três grupos e, com maior incidência, no Grupo Implante de Matriz Dérmica. Apesar de não ter significância estatística, está de acordo com a literatura, que mostra a presença evidente de macrófagos ativos, em biópsias realizadas em implantes da matriz dérmica, sendo eles os responsáveis pela degradação das fibras do colágeno existente na matriz^{7,17}.

Em relação à análise dos parâmetros do processo de formação neodérmica – neovascularização, neoformação dérmica, depósito de colágeno e canais vasculares - os resultados encontrados nos três grupos foram estatisticamente significantes, na maior parte deles com $p < 0,05$, com exceção da presença de neovascularização.

Em estudos efetuados^{13,17}, no qual se fez exame histológico seriado, para analisar o processo de neoformação dérmica a partir da matriz dérmica, verificou-se 4 diferentes fases no processo de integração do produto:

- Embebição
- Migração de fibroblastos

- Neovascularização
- Remodelação e maturação¹⁵.

As tabelas 10 a 18, apresentam os resultados relacionados à formação de neoderme nos 3 grupos estudados. Em média, os Grupos Implante de Matriz Dérmica (Figura 10) e Enxerto Autólogo (Figura 12) apresentaram maior neovascularização que o Grupo Cicatrização por Contração (Figura 14).

Analisando a presença de neovascularização durante as 3 semanas da pesquisa, observa-se que aos 7 dias novamente o processo se inicia intensamente no Grupo Implante de Matriz Dérmica, menos intensamente no Grupo Cicatrização por Contração e fracamente no Grupo Enxerto Autólogo. Aos 14 dias, o processo se intensifica mais no Grupo Implante de Matriz Dérmica e Cicatrização por Contração e mais discreto no Grupo Enxerto Autólogo. Aos 21 dias, na média, os 3 grupos apresentavam valores muito próximos, sendo que a variação do Grupo Implante de Matriz Dérmica foi para menos enquanto que nos outros dois grupos foi para mais. Esse fato sugere uma participação importante da matriz na neovascularização, ainda em uma fase precoce, de forma ordenada, enquanto que no Grupo Enxerto Autólogo o mesmo processo se fez mais tardiamente. No Grupo Cicatrização por Contração a neovascularização foi menor, podendo estar relacionado à formação do próprio tecido cicatricial que se faz de forma desorganizado.

Apesar da análise estatística aos 21 dias não ser significativa, a análise das biópsias mostra claramente que a neovascularização é muito mais intensa no Grupo Implante de Matriz Dérmica já nos primeiros dias e cresce até a segunda semana, quando já está completa e pronta para receber a camada de epiderme.

Esse fato destaca a importância da matriz no processo de reorganização ordenada da derme. Segundo alguns autores, a vascularização da pele artificial, que se reflete pela palidez à pressão, está presente 3 a 5 dias após o implante^{1,6}. A neovascularização está presente na 2ª semana, com a migração de células endoteliais que formam colunas, ou botões, vistas com marcadores endoteliais^{8,13}.

Dessa forma, no presente estudo, a neoformação vascular está praticamente pronta no final da segunda semana, principalmente no Grupo Implante de Matriz Dérmica, enquanto que nos demais grupos se completa com 21 dias.

Quando analisados o parâmetro formação de canais vasculares, observamos que eles se tornam aparentes desde a primeira semana, somente no Grupo Implante de Matriz Dérmica,

com aumento progressivo na segunda semana. Na média, aos 21 dias, o número de canais vasculares foi bem maior no Grupo Implante de Matriz Dérmica (Figura 11) do que nos outros dois grupos (Figuras 13 e 15), salientando a completa ausência destes canais no grupo cicatrização por contração. Estes resultados, aos 21 dias, foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) e estão de acordo com os estudos publicados por diversos autores, que salientam o aparecimento de canais vasculares a partir da 2ª. semana, com desenvolvimento progressivo, preparando o local para suprir de sangue e nutrientes os novos fibroblastos^{7,13}, que podem ser vistos em torno da terceira semana.

Estes resultados positivos em relação à integração da matriz dérmica são também confirmados em outros estudos. Moiemmen e cols referem que, ao final da quarta semana, a neovascularização está bem estabilizada, com canais vasculares permeáveis e que vão até a camada superficial da matriz¹³.

Quando analisada a neoformação dérmica, observou-se que ela foi mais intensa no Grupo Implante de Matriz Dérmica (Figura 16) desde a primeira semana, atingindo maior incidência com 14 dias e diminuindo sensivelmente com 21 dias, entretanto na média, os resultados no Grupo Enxerto Autólogo (Figura 17) ficaram próximos ao do Grupo Implante de Matriz Dérmica. O Grupo Cicatrização por Contração (Figuras 18 e 19) apresentou aproximadamente um terço da neoformação dérmica em relação ao Grupo Implante de Matriz Dérmica. A análise estatística comparando os três grupos, aos 21 dias, mostrou-se significativa com $p < 0,001$. Portanto, estes resultados sugerem uma regeneração dérmica no Grupo Implante de Matriz Dérmica, corroborados por outros estudos que referem que, com o uso da matriz dérmica, após 7 a 14 dias, já existe a formação de neoderme e os implantes apresentam 80% de bons resultados²⁶.

A neoderme, formada a partir de matriz de regeneração dérmica, deve ser uma estrutura convertida em um tecido ricamente suprido de vasos, fibroblastos e matriz tecidual conectiva recentemente sintetizada¹³. A matriz de colágeno recentemente sintetizada mantém muito a estrutura anatômica da derme, diferindo da usual densidade de sólidos blocos de bandas de colágeno vistos na fibrose convencional^{1,9}. Clinicamente, esse achado foi corroborado com a manutenção da elasticidade da pele e a ausência de contração nas áreas enxertadas. Em pacientes enxertados com matriz dérmica, não foram vistas cicatrizes hipertróficas num acompanhamento por 4 anos¹. As camadas de colágeno da matriz se degradam de modo lento e controlado conforme o novo tecido conectivo é sintetizado^{9,19}.

A reprodução da estrutura anatômica da derme tem também retido algumas das propriedades fisiológicas desta, como elasticidade, resistência e ausência de contraturas e cicatrizes hipertróficas^{13,26}.

Ainda em relação a formação da neoderme, é necessário analisar o depósito de colágeno nos 3 grupos. Entretanto essa discussão está relacionada com a atividade dos fibroblastos e é discutida conjuntamente nos aspectos relacionados à formação de fibrose.

Dessa forma, a próxima fase do processo de cicatrização está relacionada à remodelação e maturação dérmica. É equivalente à mesma fase com que o organismo repara as lesões espontaneamente. Inicia quando a matriz está povoada por fibroblastos e o interstício está cheio de colágeno endógeno, que gradualmente substitui a matriz de colágeno. O novo colágeno é indistinguível histologicamente da derme normal^{4,13}.

Ao avaliar o número de fibroblastos nos três grupos, aos 21 dias (tabelas 25, 26 e 27), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. No entanto, ao se avaliar a presença de fibroblastos nos grupos com 7, 14 e 21 dias (tabelas 19 a 27), percebe-se que no Grupo Enxerto Autólogo houve um aumento progressivo até 14 dias e que este aumento se manteve com 21 dias (Figura 16).

No Grupo Cicatrização por Contração, aos 7 dias, já havia uma contagem alta de fibroblastos, tendo aumentado mais aos 14 dias e diminuído aos 21 dias, mantendo-se praticamente na mesma quantidade dos outros dois grupos. No Grupo Implante de Matriz Dérmica, observou-se uma evolução diferente. Com 7 dias, a incidência de fibroblastos foi próxima à do Grupo Cicatrização por Contração, tendo diminuído para menos da metade com 14 dias e voltado a aumentar aos 21 dias, praticamente igualando-se também aos outros grupos. A análise destes resultados não foi estatisticamente significativa.

Este aumento após a segunda semana não permitiu uma conclusão satisfatória. Provavelmente, ele pode ter ocorrido porque é a partir da segunda semana que a neovascularização está completa e é quando os fibroblastos se espalham por toda a matriz dérmica para iniciar a produção de colágeno^{1,24}. Porém, esta análise necessita de estudos complementares para confirmação. Ao encontro desta hipótese, Jaksic e cols, referem que com quatorze dias, em suas pesquisas, ocorre uma extensiva infiltração de células na matriz, ocupando cerca de dois terços da derme artificial. Também neste período, bi-refringência é notada e a coloração é positiva para colágeno¹.

Embora o número de fibroblastos não tenha sido uniforme, a deposição de colágeno,

após 21 dias (tabelas 16, 17 e 18), foi mais intensa no Grupo Implante de Matriz Dérmica do que no Grupo Enxerto Autólogo e Cicatrização por Contração.

A maior diferença foi em relação ao Grupo Cicatrização por Contração, que, em média, apresentava aproximadamente dois terços da quantidade de colágeno do Grupo Implante de Matriz Dérmica. Estes resultados foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$) e sugerem, fortemente, a importância da matriz de regeneração dérmica na reconstituição da camada de colágeno dérmico.

Corroborando nossos resultados, diversos trabalhos têm mostrado que, em torno da 3ª semana, os miofibroblastos se espalham por todo o interstício da matriz dérmica e iniciam a produção de colágeno endógeno, que gradualmente substitui toda a matriz¹³, e estudos histológicos realizados em pacientes, mostraram colágeno endógeno presente a partir de 14 dias⁹. Ainda, por volta do 18º e 25º dia, o colágeno é proeminente na matriz dérmica, assim como os fibroblastos⁷.

Outros estudos controlados indicaram que, em torno de um mês, a matriz de colágeno original foi totalmente degradada e substituída pela neoderme¹. Dependendo da qualidade do leito da ferida, a integração da matriz dérmica pode ainda ocorrer entre 3 e 6 semanas²¹.

I Grant e cols., em estudo realizado com matriz dérmica Integra, considerou a integração completa após 10 dias e ressaltou que a boa qualidade do leito da ferida foi o responsável pelos bons resultados²².

A análise da retração cicatricial aos 7 dias (tabelas 19, 20 e 21) mostrou a mesma incidência nos três grupos. Aos 14 e 21 dias (tabelas 22 a 27), aumentou nos Grupos Enxerto Autólogo e Cicatrização por Contração e diminuiu progressivamente no Grupo Implante de Matriz Dérmica. Aos 21 dias, os achados histológicos de retração fibro-cicatricial foram pequenos no Grupo Implante de Matriz Dérmica (Figura 16), um pouco maiores no Grupo Enxerto Autólogo (Figura 17) e muito grandes no Grupo Cicatrização por Contração (Figuras 18 e 19). O Grupo Implante de Matriz Dérmica apresentou aproximadamente 2,5 vezes menos retração fibro-cicatricial do que o Grupo Cicatrização por Contração. Os dados comparando os três grupos aos 21 dias foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Estes resultados positivos também enfatizam que o uso da matriz dérmica reconstitui anatomicamente as porções da pele, proporcionando um melhor resultado estético e funcional, com menor retração fibro-cicatricial.

Os resultados clínicos conseguidos com pele artificial têm sido encorajadores. Longo

tempo de acompanhamento clínico e histológico continua a demonstrar que é um excelente substituto da pele. Além do mais, as muitas vantagens da técnica são: o imediato fechamento da ferida, evitando a perda de líquidos e de calor, o afastamento do problema com a rejeição e a contração da ferida, que é limitada¹.

Em termos de reação imunológica, a matriz dérmica Integra causa apenas uma mínima resposta imunológica, sem evidência de anticorpos para colágeno de pele¹⁵.

O estudo realizado mostrou que a matriz dérmica de colágeno foi a que apresentou menor reação inflamatória, maior formação de neovasos e de canais vasculares, maior deposição de colágeno endógeno, maior neoformação dérmica e menor retração fibro-cicatricial, o que pode sugerir uma nova alternativa no tratamento de pacientes que necessitem do uso de um substituto dérmico, que seja semelhante morfológica e funcionalmente à pele normal.

7. CONCLUSÕES

1. O estudo experimental em ratos permitiu conhecer com detalhes as diferentes fases de integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo.
2. A matriz dérmica de colágeno foi a que apresentou menor reação inflamatória, maior formação de neovasos e de canais vasculares, maior deposição de colágeno endógeno, maior neoformação dérmica e menor retração fibro-cicatricial.
3. A integração da matriz dérmica, neste estudo, se assemelha em resultados à integração do enxerto autólogo.

8. REFERÊNCIAS

1. Jaksic T, Burke JF. The use of “artificial skin” for burns. *Ann.Rev.Med.* 1987; 38:107-17.
2. Orgill DP, Strauss II FH, Lee RC. The use of Collagen-GAC Membranes in Reconstructive Surgery. *Annals New York Academy of Sciences* 1997; 181:233-6.
3. Phillips TJ. New Skin for Old: Development in Biological Skin Substitutes. *Archives of Dermatology.* 1998; 134:344-9.
4. Schulz III JT, Tompkins RG, Burke JF. Artificial Skin. *Annu.Rev.Med* 2000; 51:231-44.
5. Cotran RS, KV, Robbins SL, Schoen, FJ. *Inflamação e Reparação. Patologia Estrutural e Funcional.* 5ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1996. 45-83.
6. Burke JF. Observations on the development and clinical use of artificial skin: an attempt to employ regeneration rather than scar formation in wound healing. *Japanese Journal of Surgery* 1987; 17(6):431-8.
7. Stern R, McPherson M, Longaker MT. Histologic Study of Artificial Skin Used in the Treatment of Full-Thickness Thermal Injury. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 1990; 11(1):7-13.
8. Burke JF, Yannas IV, Quinby Jr. WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful Use of a Physiologically Acceptable Artificial Skin in the Treatment of Extensive Burn Injury. *Ann. Surg.* 1981; 194(4):413-28.
9. Chu C-S, Macmanus AT, Matylevich NP, Goodwin CW, Pruitt Jr BA. Integra as a Dermal Replacement in a Meshed Composite Skin Graft in Rat Model: A One-Step Operative Procedure. *The Journal of TRAUMA^R Injury, Infection, and Critical Care* 2002; 52(1):122-9.
10. Tompkins RG, Hilton JF, Burke JF, Schoenfeld DA, Hegarty MT, Bondoc CC, et al. Increased survival after massive thermal injuries in adults: Preliminary report using artificial skin. *Critical Care Medicine* 1989; 16(1):47-52.

11. Heimbach DM, Warden GD, Luterman A, Jordan MH, Ozobia N, Ryan CM, et al. Multicenter Postapproval Clinical Trial of Integra^(R) Dermal Regeneration Template for Burn Treatment. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2003; 24(1):42-8.
12. Boyce ST, Kagan RJ, Meyer NA, Yakuboff KP, Warden GD. The 1999 Clinical Research Award Cultured Skin Substitutes Combined With Integra Artificial Skin to Replace Native Skin Autograft and Allograft for the Closure of Excised Full – Thickness Burns. *Journal of Burn Care and Rehabilitation* 1999; 20(6):453-61.
13. Moiemmen NS, Staiano JJ, Ojeh NO, Thway Y, Frame JD. Reconstructive Surgery with a Dermal Regeneration Template: Clinical and Histologic Study. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2001; 108(1):93-103.
14. Orgill DP, Butler C, Regan JF, Barlow MS, Yannas IV, Compton CC. Vascularized Collagen-Glycosaminoglycan Matrix Provides a Dermal Substrate and Improve Take of Cultured Epithelial Autografts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1998; 102(2):423-9.
15. Michaeli D, MacPherson M. Immunologic Study of Artificial Skin Used in the Treatment of Thermal Injuries. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 1990; 11(1):21-6.
16. Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin: I. Basic design principles. *J. Biomed. Mater. res.* 1980; 14:65-81.
17. Orgill DP, Butler CE, Regan JF. Behavior of Collagen-GAC matrices as Dermal Replacement in Rodent and Porcine Models. *WOUNDS: A compendium of Clinical Research and Practice* 1996; 8(5):151-7.
18. Boyce ST, et al. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autografts for treatment of full-thickness burns. *Annals of Surgery* 1995; 6(222): 743-52.
19. Lam PK, Chan ESY, Liew CT, Lau CH, Yen SC, King WWK. Combination of a New Composite Biocompatible Skin Graft on the Neodermis of Artificial Skin in a n Animal Model. *Anz. J. Surg* 2002; 72:360-3.
20. Sheridan RL, Hegarty M, Tompkins RG, Burke JF. Artificial skin in massive burns. *European Journal of Plastic Surgery* 1994; 17:91-3.

21. Burke JF, Cahn F, O'Grady. *Integra Artificial Skin:Physician Training Manual*. NJ: Integra Life Sciences Corporation; 1996.
22. Grant I, Green C, Martin R. Strategies to improve the take of commercially available collagen/glycosaminoglycan wound repair material investigated in an animal model. *Burns* 2001; 27:699-707.
23. Iannas IV, Burke JF, Umbrecht M, Stasikelis P. Progress in design of an artificial skin. *Fed. Proc.* 1979; 38:988.
24. Besner GE, Klamar JE. Integra Artificial Skin as a Useful Adjunct in the Treatment of Purpura Fulminans. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 1998; 19(4):324-28.
25. Tavis MJ, Thornton JM, Danet R. Current status of skin substitutes. *Surg. Clin North Am.* 1978; 58:1233-48.
26. Winfrey ME, Cochran M, Hegarty MT. A new technology in burn therapy: Integra artificial skin. *Dimensions on Critical Care Nursing* 1999; 17(8):734-40.

9. NORMAS ADOTADAS

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - Os princípios ticos da experimentação animal.

COMISSÃO DE NOMENCLATURA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA-
Nomina anatômica. 5.ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1987. 110p.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE - Resolução no. 01/88: normas de pesquisa em saúde.
Bioética, 3:137-54, 1995.

DeCS - *Descritores em Ciências da Saúde*. 3.ed. São Paulo, Bireme, 1996. 1146p.

FESTING MFW. *International index of laboratory animals*. 6.ed. United Kingdon,
University of Leicester, 1993.

Obs: Os ratos Wistar e o camundongo da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina estão classificados no *Index*, da seguinte forma: Ratos OUTB EPM-1 (Wistar) Br Epm (2c). Camund OUTB EPM-M1 Br-Epm (2c)

GOLDENBERG S, SOARES AL. *Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses*. São Paulo, 1997 (edição eletrônica em disquete)

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL
NOMENCLATURE - *Nomina anatomica veterinaria*. 3.ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

INTERNATIONAL SERIALS DATA SYSTEM & INTERNATIONAL ORGANIZATION
FOR STANDARDIZATION - *Liste d'abbreviations de mots des titres de publications en série: conforme a ISO 4-1984/ List of serial title word abbreviation in accordance with ISO 4-1984*, Paris, ISDS/ISO, 1985. 215p.

RIVERA E. Ética, bem-estar e legislação. In: *Manual para técnicas em bioterismo*. São Paulo, Winner Graph, 1965. p11-3.

D'ACAMPORA AJ. Investigação Experimental – do Planejamento à Redação Final. Florianópolis, Papa-Livro Editora, 2001. p77-81.

ANEXOS

ANEXO 1

Especificação da Matriz de Regeneração Dérmica:

INTEGRA[®] -Matriz de Regeneração Dérmica - é um sistema de membrana de duas camadas para reposição da pele. A camada de reposição dérmica é formada por uma matriz de fibras porosas de colágeno de polimerização cruzada do tendão bovino e um glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato), fabricada com porosidade controlada e índice de degradação definido. A camada epidérmica substituta é formada por uma camada de polisiloxano (silicone), para controlar a perda de umidade da lesão.

A INTEGRA[®] - Matriz de Regeneração Dérmica - é assepticamente processada. O cartucho laminado interno e o produto devem ser manuseados usando técnicas estéreis. A matriz não deve ser esterilizada, pois as propriedades intrínsecas do produto podem ser alteradas.

A INTEGRA[®] - Matriz de Regeneração Dérmica encontra-se disponível nos seguintes tamanhos:

10 cm x 12,5 cm (4 polegadas por 5 polegadas)

10 cm x 25 cm (4 polegadas por 10 polegadas)

20 cm x 25 cm (8 polegadas por 10 polegadas)

Cada lâmina da INTEGRA[®] - Matriz de Regeneração Dérmica - é embalada em um cartucho laminado contendo aproximadamente 250 ml de álcool isopropílico a 70%. Cada cartucho laminado estéril é embalado em um cartucho externo em forma de V selado. O produto deve ser armazenado na posição horizontal sob refrigeração de 2 a 8° C.

Lote 2601510Z

Prazo de validade: 08/2004

Ref. IAS-410

ANEXO 2

Especificações da ração:

Ração Nuvilab CR1 (Conc. das substâncias por Kg de ração)

Vitaminas:

Vit. A - 1200 UI

Vit. D3 - 1800 UI

Vit. E - 30 mg

Vit. K3 - 3 mg

Vit. B1 - 5 mg

Vit B12 - 20 ug

Niacina - 60 mg

Ac. Pantotênico - 20 mg

Ac. fólico - 1 mg

Biotina - 0,05 mg

Colina - 600 mg

Microelementos minerais:

Ferro - 50 mg

Zinco - 60 mg

Cobre -10 mg

Iodo - 2mg

Manganês - 60 mg

Selênio - 0,05 mg

Cobalto - 1,50 mg

Aminoácidos:

DL - Metionina - 300 mg

Lisina - 100 mg

Antioxidante - 100 mg