



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO - CIRÚRGICAS**

**JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA**

**QUANTIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA DO COLÁGENO EM  
QUEIMADURAS CUTÂNEAS POR MEIO DA DIMENSÃO FRACTAL,  
LACUNARIDADE E TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER**

**FORTALEZA**

**2022**

**JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA**

**QUANTIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA DO COLÁGENO EM  
QUEIMADURAS CUTÂNEAS POR MEIO DA DIMENSÃO FRACTAL,  
LACUNARIDADE E TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

**Orientadores:**

Prof. Titular Dr. José Alberto Dias Leite.  
Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R1q Rocha, José Lima de Carvalho.  
Quantificação da organização e arquitetura do colágeno em queimaduras cutâneas por meio da dimensão fractal, lacunaridade e transformada rápida de Fourier / José Lima De Carvalho Rocha. – 2022.  
157 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.  
Coorientação: Prof. Dr. Charles Jean Gomes Mesquita.
1. Queimaduras. 2. Colágeno. 3. Bleomicina. 4. Fractais. 5. Análise de Fourier. I.  
Título.

JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA

QUANTIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA DO COLÁGENO EM  
QUEIMADURAS CUTÂNEAS POR MEIO DA DIMENSÃO FRACTAL,  
LACUNARIDADE E TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

**Orientadores:**

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita (Orientador)  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Márcio Wilker Soares Campelo  
LABICONTE-UFC

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Barros Jucá  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Prof. Dr. José Atualpa Pinheiro Jr.  
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais Roberto e Maria Lúcia presença física e mental em todos os momentos da minha vida. Com eles aprendi a ética e o amor pela ciência.

Aos meus irmãos biológicos e da Medicina, que muito ajudaram a manter vivo e mesmo potencializar, os valores implantados por meus pais.

Para Valéria, que dedica paciência, amor e incentivo ao Autor desde 1976.

Para Priscila e Murilo que cuidadosamente toleram o pai e Autor e apesar da idade ainda aceitam as minhas orientações.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Titular Doutor José Alberto Dias Leite, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará. Orientador e grande incentivador da complementação da minha formação acadêmica. Sem esse incentivo, esta pesquisa não ocorreria.

Ao Professor Doutor Charles Jean Gomes de Mesquita, Professor do Curso de Medicina da Unichristus. Co-orientador com inestimável contribuição para esse trabalho.

"A coisa mais difícil de ser detida no mundo é a marcha de uma grande ideia"

Theilhard de Chardin (1881-1955)

## RESUMO

**QUANTIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO E ARQUITETURA DO COLÁGENO EM QUEIMADURAS CUTÂNEAS POR MEIO DA DIMENSÃO FRACTAL, LACUNARIDADE E TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER.** JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA. TESE (DOUTORADO). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará. Orientadores: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite e Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita.

O escopo do tratamento de queimaduras estende-se além da preservação da vida e função, buscando permitir que os sobreviventes voltem a se sentir plenamente produtivos e aceitos em suas comunidades. A cicatrização/reparo de uma queimadura, quando complicada por infecção, inflamação crônica, reação tipo corpo estranho, por tendência inata à fibrose ou hiper cicatrização pode resultar em quelóides, bridas e/ou cicatrizes hipertróficas. O colágeno constitui até 80% da derme papilar e quase 90% da derme reticular, sendo o maior responsável pelas propriedades mecânicas e físicas da pele. É possível assumir que as alterações do tegumento pós-queimadura devem-se a mudanças na organização, microestrutura, orientação e textura do colágeno. Na área biomédica, a Dimensão fractal (DF) e a lacunaridade têm sido utilizadas em pesquisas acerca do padrão de crescimento e da plasticidade neuronal e células gliais, células neoplásicas, análise estática e dinâmica da vasculatura renal e pulmonar, quantificação da rejeição pós-transplante cardíaco, quantificação do dano fibrótico em cirrose e em cápsulas periprótese de silicone, dentre outras aplicações. Os objetivos desta tese foram avaliar quantitativamente por meio de um programa analisador de imagens, a Dimensão Fractal, a Lacunaridade e o padrão de deposição do colágeno global (Col-G) e dos tipo I (Col-1) e tipo III (Col-3) em pele de camundongos submetidos a queimaduras de espessura parcial, tratadas com bleomicina (BLEO) ou soro fisiológico 0,9% (SAL) intralesional, mensurando também a organização arquitetural dessas fibras colágenas por intermédio da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A Dimensão Fractal é capaz de diferenciar efetivamente queimaduras tratadas com salina (SAL) ou BLEO daquelas da pele intacta (CTRL). Os valores da DF do Col-G no grupo BLEO aproximam-se dos do CTRL, sendo também maiores que os do grupo SAL em todos os momentos exceto em D4. Ocorreu diferença significativa da DF do Col-1 intergrupos SAL e BLEO apenas em D21. Ocorreram diferenças significativas da DF do Col-3 intergrupos SAL e BLEO em todos os momentos, demonstrando que as alterações neste tipo de colágeno contribuiu mais do que as do Col-1 para as alterações estruturais do colágeno. A lacunaridade do Col-G foi significativamente maior no grupo SAL no D7, Col-1 e Col-3 foi maior durante a fase proliferativa e, também, ao final do processo cicatricial no grupo bleomicina, demonstrando uma ação dual desta substância na modulação da proliferação e remodelação do colágeno. A orientação das fibras colágenas apresentou valores mais próximos da pele intacta no grupo tratado com salina. A bleomicina foi capaz de alterar significativamente a reorientação das fibras colágenas ao final do processo reparativo.

**Palavras-chave:** Queimaduras; Colágeno; Bleomicina; Fractal; Análise de Fourier

## ABSTRACT

**MEASUREMENT OF ORGANIZATION AND COLLAGEN ARCHITECTURE IN SKIN BURNS THROUGH FRACTAL DIMENSION, LACUNARITY AND FAST FOURIER TRANSFORM.** JOSÉ LIMA DE CARVALHO ROCHA. PhD Thesis, Post-Graduation Program in Surgery. Federal University of Ceará. Supervisors: José Alberto Dias Leite (Full Professor, PhD, MSc) and Charles Jean Gomes de Mesquita (PhD, MSc).

The scope of the treatment of burns extends beyond the preservation of life and function, seeking to allow the survivors the return to feeling productive and fully accepted in their communities. The healing / repair of a burn, when undergoing uncontrolled infection, chronic inflammation, foreign body reactions or innate tendency to fibrosis or hyper healing may result in keloids, flanges and / or hypertrophic scars. Collagen makes up 80% of the papillary dermis and almost 90% of the reticular dermis, being most largely responsible for the mechanical and physical properties of the skin. It is possible to assume that post-burn integument changes are due to changes in the organization, microstructure, orientation and collagen texture. In the biomedical field, the Fractal Dimension and lacunarity have been used in research on the growth pattern and neuronal plasticity and glial cells, cancer cells, static and dynamic analysis of renal and pulmonary vasculature, quantification of cardiac transplantation rejection, quantifying cirrhosis and fibrotic damage on periprostheses silicone capsules, among other applications. The objectives of this thesis were to evaluate quantitatively by means of an image analyzer program, Fractal Dimension, Lacunarity and the pattern of deposition of collagen type I and type III in the skin of mice subjected to partial thickness burns, treated or not with bleomycin also measuring the architectural organization of these collagen fibers through the Fast Fourier Transform. The fractal dimension was able to effectively differentiate burns treated with saline or bleomycin from those of healthy skin. The values of fractal dimension in the bleomycin group were approaching the values found in normal skin. The lacunarity of collagen type III was higher during the proliferative phase and also at the end of the healing process in the bleomycin group, which shows a dual action of this substance in the modulation of the proliferation and the collagen remodeling. The orientation of the collagen fibers presented values closer to those of the intact skin in the group treated with saline. Bleomycin has been able to significantly change the reorientation of collagen fibers at the end of the repair process.

**Keywords:** Burns; Collagen; Bleomycin; Fractals; Fourier Analysis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– As três zonas de injúria de Jackson em uma queimadura do tornozelo: a) zona de coagulação; b) zona de estase e c) zona de hiperemia (Adaptado de Herndon, 2012) .....	31
Figura 2	– Representação esquemática dos diferentes estratos da epiderme .....	38
Figura 3	– Representação esquemática da percentagem de segmentos corporais nos adultos (A) e em crianças (B) segundo o método de Wallace (Regra dos Nove) .....	41
Figura 4	– Representação esquemática da percentagem de segmentos corporais em adultos conforme o método de Lund-Browder .....	41
Figura 5	– Dados empíricos de Richardson acerca da taxa de aumento da extensão de diversas costas de países e fronteiras internacionais, medidas com réguas (escalas) progressivamente menores (Adaptado de Mandelbrot, 1982) .....	55
Figura 6	– Demonstração da mudança da extensão do litoral norte da Grã-Bretanha de acordo com diversos tamanhos de segmentos de reta ou escala ( $\eta$ ) utilizados para mensuração. Adaptado de Mandelbrot, 1967 .....	55
Figura 7	– Demonstração da dimensão Hausdorff-Besicovitch por meio da divisão de figuras unidimensionais (reta), bidimensional (quadrado) e tridimensional (cubo) em partes semelhantes. (Adaptado de Mandelbrot, 1982) .....	57
Figura 8	– Ramificação brônquica e vascular pulmonar. Um exemplo de objeto fractal natural (Adaptado de Weibel, 2011). .....	60
Figura 9	– Fractais geométricos. A) Conjunto de Mandelbrot; B) Curva de Koch; C) Floco de neve de Koch e D) Triângulo de Sierpinski .....	62
Figura 10	– Construção do Tapete de Sierpinski .....	64
Figura 11	– A) tapete de Sierpinski; B) cobertura do tapete de Sierpinski com caixas progressivamente menores .....	64
Figura 12	– Exemplo de correlação <i>log-log</i> para estimativa da dimensão fractal pelo <i>Box-counting</i> executado manualmente (Adaptado de Guandalini, 2006) .....	66

Figura 13 – Exemplo de correlação <i>log-log</i> para estimativa da dimensão fractal pelo <i>Box-counting</i> executada no ImageJ (Rasband, 1997-2010) .....	66
Figura 14 – Exemplo de contagem de caixas e correlação <i>log-log</i> para estimativa da dimensão fractal da trilha mínima da vasculatura em imagem tumoral (BAISCH; KAIN, 2000) .....	67
Figura 15 – Dois exemplos de poeira de Cantor de mesma dimensão fractal e de lacunaridades diferentes (Adaptada de Plotnick, Garner e O'Neill, 1993) .....	69
Figura 16 – Criação de uma onda senoidal a partir de uma circunferência .....	72
Figura 17 – Representação esquemática do experimento .....	76
Figura 18 – Estrutura química do Sirius Red F3BA .....	78
Figura 19 – Captura da tela durante o processo de aquisição da imagem corada pelo picosirius sob polarização .....	80
Figura 20 – Captura da tela durante o processo de binarização da imagem corada pelo picosirius sob polarização .....	80
Figura 21 – Captura da tela do processo de mensuração da dimensão fractal e lacunaridade do colágeno global utilizando o plugin FracLac do ImageJ .....	81
Figura 22 – Captura da tela do processo de mensuração da dimensão fractal e lacunaridade do colágeno tipo I e tipo III utilizando o plugin FracLac do ImageJ .....	81
Figura 23 – Imagem teste a 0° .....	82
Figura 24 – Imagem teste a 90° .....	82
Figura 25 – Imagem teste a 45° .....	83
Figura 26 – Sequência completa do processamento da imagem teste a 90° .....	84
Figura 27 – Passo final do processamento da imagem teste a 0° .....	90
Figura 28 – Passo inicial e final do processamento da imagem teste a 45° .....	90
Figura 29 – Passo inicial da mensuração da organização do colágeno .....	91
Figura 30 – Passo intermediário da mensuração da organização do colágeno .....	91
Figura 31 – Passo final da mensuração da organização do colágeno .....	92
Figura 32 – Histograma de freqüência dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global na pele intacta .....	96

- Figura 33 – Valores médios e desvios padrões da dimensão fractal do colágeno global (Col-G) no grupo controle intacto (CTRL) e nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos. A análise de variância (ANOVA) 1 fator com teste de Dunnett mostrou que houve diferença extremamente significativa Intergrupos SAL e CTRL em todos os momentos ( $p < 0,0001$ ). Intragrupo SAL ocorreu diferença estatisticamente significativa entre d4 vs. d7 ( $p < 0,05$ , ANOVA 1 fator com Teste de Tukey) ..... 97
- Figura 34 – Valores da dimensão fractal do colágeno global (Col-G) nas queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo e no grupo controle (CTRL) não queimado. Intragrupo BLEO não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os diversos momentos pós-queimadura ( $p = 0,01917$ , ANOVA 1 fator). Na comparação lintergrupos BLEO e CTRL houve diferença significativa em todos os momentos ( $p < 0,0001$ ) (ANOVA 1 fator com teste de Dunnett) ..... 98
- Figura 35 – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno global (Col-G) entre as queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste t de Student para amostras não correlacionadas ocorreram diferenças estatisticamente significativas intergrupos em d7 ( $p = 0,0012$ ), d14 ( $p < 0,0001$ ) e d21 ( $p = 0,0078$ ) pós-queimadura. .... 99
- Figura 36 – Dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-1) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos do estudo e no grupo intacto (CTRL). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre CTRL e d7 (ANOVA 1 fator com teste de comparações múltiplas de Dunnett). Na análise intragrupo SAL não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os diversos momentos ( $p = 0,2444$ , ANOVA 1 fator para amostras independentes) ..... 101

- Figura 37 – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-1) entre o grupo intacto (CTRL) e as queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. A ANOVA associada ao teste de Dunnett mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os valores da DF do CTRL e todos os momentos do grupo BLEO. Na comparação intragrupo BLEO ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre todos os momentos e d21 ( $*p < 0,05$ , ANOVA com teste de Tukey) ..... 103
- Figura 38 – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-G) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste T de Student para amostras não emparelhadas, ocorreu diferença estatisticamente significativas intergrupos apenas no d21 pós-queimadura ( $p = 0,0001$ ) ..... 104
- Figura 39 – Dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos do estudo. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0055$ , 1-way ANOVA, Tukey post-hoc) entre d7 e d21 pós-queimadura ..... 106
- Figura 40 – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) entre o grupo intacto (CTRL) e as queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. A ANOVA 1 fator não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2233$ ) entre os valores da DF do CTRL em nenhum momento. Na comparação intragrupo BLEO a ANOVA também não evidenciou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,3230$ ) ..... 107
- Figura 41 – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste t de Student para amostras não emparelhadas, ocorreu diferença estatisticamente significativas intergrupos em todos os momentos (d4  $p = 0,0094$ ; d7  $p < 0,0001$ ; d14  $p < 0,0001$ ; d21  $p < 0,0001$ ) ..... 108

Figura 42 – Histograma de freqüência dos valores da lacunaridade do colágeno global na pele intacta .....	110
Figura 43 – Lacunaridade do colágeno global no grupo Salina e Controle.....	111
Figura 44 – Lacunaridade do colágeno global no grupo Bleomicina e Controle .....	112
Figura 45 – Comparação da Lacunaridade do colágeno global intergrupos Salina e Bleomicina .....	113
Figura 46 – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Salina e Controle .....	115
Figura 47 – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Bleomicina e Controle .....	116
Figura 48 – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Salina e Bleomicina ....	117
Figura 49 – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Salina e Controle .....	119
Figura 50 – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Bleomicina e Controle .....	120
Figura 51 – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Salina e Bleomicina .....	121
Figura 52 – Orientação do colágeno global intergrupos Controle, Salina e Bleomicina .....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo intacto (CTRL) .....	96
Tabela 2	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo Salina em diferentes momentos pós-queimadura .....	97
Tabela 3	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) global do colágeno global nos diferentes tempos no grupo Salina (controle positivo) .....	98
Tabela 4	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno global nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	100
Tabela 5	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I (Col-1) nos diferentes tempos no grupo Salina (SAL) .....	102
Tabela 6	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I (Col-1) nos diferentes tempos no grupo Bleomicina (BLEO) .....	103
Tabela 7	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	105
Tabela 8	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo III (Col-3) nos diferentes momentos no grupo Salina (SAL) .....	106
Tabela 9	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo III (Col-3) nos diferentes tempos no grupo Bleomicina (BLEO) .....	107
Tabela 10	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	109
Tabela 11	– Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo intacto (CTRL) .....	111

Tabela 12 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno global nos diferentes tempos no grupo Salina (SAL) .....	112
Tabela 13 – Estatística referente a lacunaridade do colágeno global no grupo Bleomicina .....	113
Tabela 14 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno global nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	114
Tabela 15 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes tempos no grupo Salina .....	115
Tabela 16 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes tempos no grupo Bleomicina .....	116
Tabela 17 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	118
Tabela 18 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes tempos no grupo Salina .....	119
Tabela 19 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes tempos no grupo Bleomicina .....	120
Tabela 20 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	122
Tabela 21 – Estatística descritiva dos valores da angulação (organização) do colágeno com relação à epiderme nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) .....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
ABA	American Burns Association
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
ANOVA	Análise de Variância
AQT	Área Queimada Total
ATB	Árvore Traqueobrônquica
BFGF	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
BLEO	Bleomicina
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
Col-1	Colágeno tipo I
Col-3	Colágeno tipo III
Col-G	Colágeno Global
CPPQS	Cicatrizes Patológicas Pós-Queimaduras
CSF	Fator Estimulante de Colônias
CTQ	Centro de Tratamento de Queimados
CTRL	Colágeno Global do Grupo Intacto
d.C	Depois de Cristo
DF	Dimensão Fractal
DFL	Dimensão Fractal Local
DOR	Densidade Óptica Radiográfica
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FFT	Fast Fourier Transform
GAGs	Glicosaminoglicanos
GH	Hormônio de Crescimento
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IF $\alpha$	Interferon Alfa
IJF	Instituto Dr. José Frota
IL	Interleucinas
INF	Interferon
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
IP	Intraperitoneal

LABCEX	Laboratório de Cirurgia Experimental
LPS	Lipopolisacaridasas
MEC	Matriz Intersticial ou Extracelular
MMP	Metaloproteinases
MSR	<i>Mass radius relation</i>
MSS	<i>Manchester Scar Scale</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
POSAS	<i>Patient and Observer Scar Assessment Scale</i>
PSR	<i>Picrosirius red</i>
REMIT	Resposta Endócrina-Metabólica e Imunológica ao Trauma
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROI	Região de Interesse
ROI	<i>Regions of interest</i>
ROS	Radicais Livres de Oxigênio
SAL	Salina
SAMM	Sistema de Análise Morfométrica e Morfológica
SBCAL/COBEA	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SBQ	Sociedade Brasileira de Queimaduras
SCQ	Superfície Corporal Queimada
SIM	Sistema de Informações de Mortalidade
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SRF	Fator de Resposta Sérica
SUS	Sistema Único de Saúde
TCSC	Tecido Celular Subcutâneo
TGFβ	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPA	Ativador Tissular do Plasminogênio
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNICHRISTUS	Centro Universitário Christus
US	Ultrassonografia
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VSS	<i>Vancouver Scar Scale</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1	Justificativa	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>28</b>
3.1	Queimaduras. Considerações gerais	28
3.2	Fisiopatologia da queimadura	29
3.3	Classificação de queimaduras cutâneas e CCPQ	36
3.4	Modelos de queimadura	44
3.5	Terapêutica das cicatrizes pós-queimaduras	46
3.6	Métodos de avaliação de queimaduras	47
3.7	Análise fractal na avaliação de queimaduras	51
3.8	Análise de imagens pela Transformada Rápida de Fourier	71
<b>4</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>73</b>
4.1	Caracterização do estudo	73
4.2	Ambiente de experimentação	73
4.3	Animais	74
4.4	Anestesia	74
4.5	Indução da queimadura	75
4.6	Divisão em grupos e tratamento	76
4.7	Técnicas de processamento histológico	77
4.8	Análise das imagens	78
4.9	Estatísticas	93
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>94</b>
5.1	Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno	95
5.1.1	<i>Dimensão Fractal do colágeno global</i>	95
5.1.2	<i>DF dos colágenos tipo I e tipo III</i>	101
5.2	Lacunaridade do colágeno	110
5.2.1	<i>Lacunaridade do colágeno global</i>	110
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>125</b>
6.1	Da escolha do tema	125
6.2	Do modelo experimental	128
6.3	Do modelo de queimadura	136

<b>6.4</b>	<b>Dos tempos de observação .....</b>	<b>137</b>
<b>6.5</b>	<b>Da avaliação histológica .....</b>	<b>138</b>
<b>6.6</b>	<b>Da dimensão fractal do colágeno .....</b>	<b>139</b>
<b>6.7</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>148</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>149</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O domínio da produção do fogo pelos hominídeos nos primórdios da existência da espécie humana possibilitou a construção de fogueiras, trazendo os benefícios da luz e do calor, permitindo ao homem minorar as trevas da caverna que lhe servia de abrigo, afastar feras famintas, suportar o frio, preparar alimentos e, ao redor destas fogueiras primordiais, lhe foi possível estabelecer a socialização, o aprimoramento de técnicas e habilidades, além de assegurar-lhe uma certa tranquilidade essenciais ao surgimento das artes (XU, 2004; MESQUITA, 2011).

A humanidade aprendeu, de maneira dolorosa, que o fogo deve estar sempre sob rigoroso controle. Por volta do ano 4.000 a.C., médicos e sacerdotes do crescente fértil, egípcios, mesopotâmicos e hindus, já tratavam queimaduras utilizando produtos vegetais como resinas e *aloe vera*, secreções humanas e tecidos de outros animais, como placenta, leite materno, âmbar e mel. Pinturas rupestres datadas de mais de 3.500 anos a.C demonstram o reconhecimento e o tratamento de queimaduras (BRANSKI; HERNDON; BARROW, 2012). Papiros antigos como o de Edwin Smith (c.1500 a.C.) e o de Ebers (c.1500 a.C.) trazem descrições de tratamentos tópicos de queimaduras com terra úmida, excrementos de animais, pão macerado e betume. Infusões de ópio e beladona eram utilizados para aplacar a dor e facilitar os banhos sulfurosos para retirada de escaras. Por volta de 600 a.C., chineses usavam tinturas e extratos de folhas de chá. Cerca de 200 anos depois, Hippocrates de Kós descreveu o uso de gordura de porco e resina vegetal em curativos. Galeno (130-210 dC.), por sua vez, menciona o uso de vinho e mirra como loções, provavelmente por suas propriedades bacteriostáticas. Contemporâneo de Galeno, o médico árabe Rhases recomendava água fresca no alívio da dor (MAJNO, 1975; STIEFEL; SHANER; SCHAEFER, 2006; PECANAC *et al.*, 2013).

Conceitualmente, queimaduras são feridas traumáticas ocasionadas em determinada parte do organismo pela exposição ou contato com chamas, materiais sólidos ou líquidos extremamente frios ou quentes, fontes de energia elétrica, química ou radioativa, por atrito ou fricção. As queimaduras atuam nos tecidos de revestimento do corpo humano determinando destruição parcial ou total da pele e de seus anexos, podendo atingir camadas mais profundas como tecido celular subcutâneo (TCSC), fáscias, músculos, tendões e até mesmo ossos. (ABA, 2005; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2008; SBQ, 2015).

Felizmente, nos últimos cinquenta anos, a sobrevivência de vítimas de queimaduras graves tem aumentado significativamente, graças à combinação de avanços no atendimento pré-hospitalar e em cuidados críticos, como otimização da ressuscitação, manejo intensivo de lesões associadas, controle de infecções e do hipercatabolismo, tentativas de modulação da resposta endócrino-metabólica e imunológica ao trauma (REMIT), reabilitação funcional precoce e aporte nutricional intensivo (MONAFO, 1992; BHATTACHARYA, 2010).

Atualmente, pessoas com até 90% de superfície corporal queimada (SCQ) podem sobreviver em centros especializados, infelizmente com graves sequelas. O escopo do tratamento estende-se além da preservação da vida e função, com o objetivo de permitir que os sobreviventes voltem a se sentir plenamente produtivos e aceitos nas suas comunidades (HERNDON, 2012).

A reparação das perdas do revestimento cutâneo ocorre através de uma sequência de eventos e processos intrínsecos complexos e interrelacionados de inflamação, hemostasia, reepitelização, angiogênese, linfogênese, formação do tecido de granulação e deposição da matriz intersticial ou extracelular (MEC) (MARTIN, 1997; SINGER; CLARK, 1999; SHAW; MARTIN, 2009).

O processo de reparo é classicamente dividido em três fases distintas e sequenciais: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelação tecidual. Essas fases se sobrepõem temporalmente, e são caracterizadas pela população celular predominante em cada uma delas (CLARK, 1996; SINGER; CLARK, 1999). Shaw e Martin (2009) propuseram 4 fases para a cicatrização de feridas: 1) resposta imediata; 2) resposta inflamatória; 3) proliferação, migração e contração e 4) resolução (estas fases serão detalhadas no Cap. 3, Revisão da Literatura).

No processo de auto reparo tissular o colágeno atua controlando a migração, multiplicação e apoptose *celular*. Tal controle acontece por intermédio do reconhecimento do colágeno por integrinas específicas e através da transferência de sinais mecânicos pelo efeito de vizinhança (LAPIERE, 2003). Na fase fibroblástica do reparo, a produção de colágeno aumenta gradativamente até a 3ª semana. Concomitantemente, ocorre a remodelação tecidual que vai deste ponto e perdura indefinidamente (MARTIN, 1997).

As cicatrizes patológicas pós-queimaduras (CPPQs) compartilham de uma fisiopatologia que pode ser denominada de hipercicatrização. Surgem em decorrência de uma superprodução de colágeno durante o reparo e aparecem mais

comumente quando este reparo se prolonga, estando assaz associadas à uma regulação ineficiente da apoptose das células sintetizadoras do colágeno e/ou a uma REMIT exuberante que prolongam a produção/deposição do colágeno e aumentam a resposta contrátil da ferida (GANGEMI *et al.*, 2008; MESQUITA, 2010; DOMERGUE; JORGENSEN; NOËL, 2014).

O colágeno é uma proteína de fundamental importância na constituição da MEC do tecido conjuntivo. Corresponde a cerca de 75% do peso seco da pele. Constitui, em média, 80% da derme papilar e quase 90% da derme reticular. O tecido conectivo constituinte da derme é classificado como denso e irregular com uma trama tridimensional de feixes de colágeno randomicamente orientados. Pela sua microestrutura, organização e orientação dos feixes e fibras, o colágeno é o maior responsável pelas propriedades mecânicas e físicas da pele (ROCHA *et al.*, 2005). O grau de ordenamento, a densidade e a orientação dos feixes de fibras colágenas correspondem ao fenótipo exibido pela pele e vêm sendo estudados há quase meio século por meio da microscopia do colágeno.

Na pele humana intacta a proporção entre colágeno I e colágeno III é cerca de 3:1. Entretanto, esta proporção cai para 2:1 após uma queimadura. Durante o processo de remodelação tissular o colágeno tipo III é gradualmente substituído pelo tipo I (PROCKOP *et al.*, 1979; CUTTLE *et al.*, 2005). Para avaliar o colágeno, Montes e Junqueira (1991) descreveram o método da picrossírius polarização. Tal método consiste no exame sob microscópio de luz polarizada de secções histológicas de pele coradas pelo Sirius Red F3BA e acidificadas pelo ácido pícrico, servindo bem para diferenciar colágeno I do III, baseando-se na correlação entre birrefringência e estrutura das fibras colágenas (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; CUTTLE *et al.*, 2005). Pelo método, o colágeno tipo I mostra-se como fibras mais densamente empacotadas que exibem intensa birrefringência e tingem-se em tom amarelo ou vermelho, enquanto o colágeno III é visto como fibras mais finas e esparsas coradas em tons de verde. A birrefringência intrínseca de determinado material é determinada pela orientação e força de oscilação de todas as transições eletrônicas das moléculas. A birrefringência textural do colágeno depende, por sua vez, da concentração, da geometria, estado organizacional e orientação dos feixes de fibras (VIDAL, 1987; RIBEIRO *et al.*, 2013). O brilho exibido por um objeto birrefringente – como o colágeno –, quando colocado sob a luz polarizada deve-se ao retardo óptico, comportando-se de maneira não linear. O colágeno e suas

propriedades são detalhados na revisão da literatura (Cap. 3). Estudos de colágeno em tecidos não submetidos à queimadura sugerem uma diferença na complexidade e homogeneidade na sua estrutura, no padrão de deposição e organização, dependendo do tratamento ou forças mecânicas a que são expostos. Cuttle *et al.* (2005), Mesquita (2008) e Mesquita *et al.* (2010) confirmaram a utilidade da técnica para diferenciar o colágeno I e III em amostras de pele submetida à queimaduras.

A Geometria Fractal, criada e difundida pelo matemático franco-americano Benoit Mandelbrot (1924-2010), faz parte, juntamente com os Sistemas Dinâmicos, da Ciência do Caos (JANOS, 2008). Os estudiosos do Caos buscam encontrar a ordem subjacente na aparente desordem e aleatoriedade dos fenômenos naturais e biológicos, que exibem, predominantemente, comportamento não linear e aperiódico, como por exemplo, o movimento planetário e das marés, o crescimento alométrico de cristais, o quebrar aleatório de ondas marinhas, a expressão eletrofisiológica das ondas cerebrais e do ritmo cardíaco (GOLDBERGER; RIGNEY; WEST, 1990; MESQUITA, 2014).

A Geometria Fractal tem como objeto de estudo os fractais, um método relativamente novo de representação e análise de sinais, imagens e informações que exibem um padrão de comportamento mais regular dentro de um conjunto maior de dados com um padrão global aparentemente irregular (CAMPBELL, 1997). A mensuração da dimensão fractal é um método advindo da Geometria Fractal que tem sido utilizado para estudos do comportamento de ações na bolsa, na análise da emissão de sinais de rádio, design de antenas receptoras de celulares, dispersão de eletricidade e sensoriamento remoto por satélites, dentre outras aplicações (SMITH; LANGE; MARKS, 1996; WERNER *et al.* 1999).

Modelos discretos de avaliação se baseiam em relações simples (como o modelo binário), em interação espaço-temporal e produzem resultados confiáveis através do uso de ferramentas como a Transformada Rápida de Fourier (FFT, na sigla em inglês) que, embora matematicamente complexa, pode ser introduzida num algoritmo computacional que acelera a análise dos dados.

A Transformada de Fourier é uma ferramenta matemática que afirma que qualquer padrão no espaço e tempo pode ser pensado como uma superposição de padrões senoidais com diferentes frequências (STEWART, 2013).

Em 1822, o matemático francês Barão Joseph Fourier (1768-1830) descobriu que ondas senoidais podem ser usadas como blocos para construir, ou

descrever, qualquer tipo de onda periódica. As frequências componentes podem ser utilizadas para analisar padrões, levar-lhes ordem, extrair características importantes e remover ruído aleatório. Fourier usou isso como ferramenta analítica no estudo das ondas e dos fluxos de calor. Séries de Fourier são usadas frequentemente em processamento de sinais e análise estatística de séries temporais. A técnica para se transformar uma forma de onda complexa em suas componentes sinusoidais é chamada de Transformada de Fourier. Quando utilizada em grandezas discretas é chamada Transformada Rápida de Fourier. A técnica de Fourier é largamente usada, por exemplo, em processamento de imagens, para comprimir dados de imagens fotográficas digitais, analisar terremotos, e investigar a estrutura de moléculas biológicas como o DNA e colágeno.

Na avaliação quantitativa da orientação dos feixes de fibras colágenas dois métodos de mensuração tem sido propostos na literatura. Noorlander *et al.* (2002) desenvolveu um método para quantificar na derme os feixes individuais em amostras coradas pelo vermelho de picrosírius usando o comprimento das dez maiores fibras colágenas no plano do corte histológico para caracterizar a orientação global das fibras. O mesmo método foi depois aplicado em um estudo experimental acerca dos efeitos do estiramento sobre o colágeno da pele porcina (Melis *et al.*, 2002) e, também por Leite Filho (2015) em estudo de queimaduras cutâneas de espessura parcial em ratos tratadas ou não com imiquimode. A orientação dos feixes de colágeno também foi quantificada pela análise de Fourier por de Vries *et al.* (2000) e Van Zuijlen *et al.* (2002a,b). Estes autores validaram o método, mostrando também que a FFT pode ser usada de forma reprodutível com este objetivo. A análise de Fourier além de ter sido aplicada para determinar de forma objetiva a orientação do colágeno em doenças da pele e em cicatrizes cutâneas (van Zuijlen *et al.*, 2002a,b; Har-Shai *et al.*, 2003; van Zuijlen *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2005; Har-Shai *et al.*, 2006; Singer & McClain., 2006,) também tem sido amplamente utilizada para quantificar a orientação de estruturas em outros tecidos como ligamentos (Chaudhuri *et al.*, 1987), *annulus fibrosus* (Guerin: Elliott, 2006) e células do endotélio vascular (Palmer; Bizios, 1997)

## 1.1 Justificativa

Já que o colágeno é o principal componente estrutural da pele é possível assumir que as alterações do tegumento pós-queimadura devem-se à mudanças na sua organização, orientação e textura. Na área biomédica, a Geometria Fractal tem sido utilizada em pesquisas acerca do padrão de crescimento e plasticidade de neurônios e células gliais, estudos do comportamento de células neoplásicas, análise estática e dinâmica da vasculatura renal e pulmonar, quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco, do dano fibrótico em cirrose e da fibrose em cápsulas periprótese de silicone, dentre muitas outras pesquisas (VASILESCU *et al.* 2003; MOREIRA *et al.* 2011; MESQUITA, 2014).

A utilização conjunta da dimensão fractal e lacunaridade na análise de imagens microscópicas de queimaduras em diferentes fases de cicatrização tem o potencial de trazer novos elementos ao estudo de técnicas e tratamentos dispensados a esta fatalidade.

Ademais, dados acerca da organização do colágeno, obtidos a partir do uso da Transformada Rápida de Fourier por método computacional poderiam favorecer a implantação de medidas específicas para prevenir ou minimizar cicatrizes cutâneas pós-queimaduras,

Neste contexto, estudos experimentais que tenham por objetivo modular ou compreender melhor os processos de cicatrização podem contribuir para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, sendo, portanto de grande interesse para as Ciências Médico-Cirúrgicas.

## 2 OBJETIVOS

1. Avaliar quantitativamente por meio da Dimensão Fractal e Lacunaridade o padrão de deposição do colágeno tipo I e tipo III em pele de camundongos submetidos à queimaduras de espessura parcial tratadas ou não com bleomicina.
2. Avaliar por intermédio da Transformada Rápida de Fourier a organização arquitetural das fibras colágenas em pele de camundongos submetidos à queimaduras de espessura parcial tratadas ou não com bleomicina.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Queimaduras: considerações gerais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a queimadura é o quarto tipo de lesão mais comum no mundo. A OMS estima em 265.000 o número anual de mortes decorrentes de queimadura por fogo/chamas, excluindo-se os outros óbitos por queimaduras químicas, eletricidade, contato com substâncias ou líquidos quentes e demais formas de queimaduras. Mais de 95% das queimaduras por incêndio ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2014). A taxa de mortalidade nestes países é de 4,3/100.000 habitantes, enquanto nos países ricos é de 0,4/100.000 habitantes (PECK; PRESSMAN, 2013).

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), cerca de um milhão de pessoas são vítimas de queimaduras (SBQ, 2015). Dados preliminares referentes ao ano de 2013 disponibilizados pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde mostram que o número de vítimas fatais por queimaduras foi de 2.774 naquele período, correspondendo a quase 2% do total de óbitos decorrentes de causas externas (MS/SVS/CGIAE – SIM, 2015). No ano de 2014 ocorreram mais de 120.000 internações no sistema único de saúde (SUS) brasileiro devido à queimaduras por fogo/chamas, químicos, eletricidade, radiação, temperatura, pressão extrema, contato com fontes de calor e substâncias quentes, correspondendo a 18% das internações do grupo das causas externas (BRASIL, DATASUS, 2015).

As queimaduras geram custos financeiros elevados, em geral associados à complexidade do tratamento e à exigência de infraestrutura adequada, constituindo importante problema de Saúde Pública, especialmente em países classificados como de média e baixa renda (PECK; PRESSMAN, 2013).

No Brasil e em países de baixa ou média renda, a maioria das queimaduras acontece em ambiente domiciliar, e as vítimas tendem a ser crianças de até oito anos de idade, do sexo masculino, tendo como regiões mais acometidas a cabeça e o pescoço, sendo o fogo a principal causa de queimaduras (FORJUOH, 2006; BRASIL, 2010). Embora os idosos respondam por apenas 10% dos casos eles exibem a maior taxa de mortalidade relativa (BERNZ *et al.*, 2009; CANTARELLI *et al.*, 2013).

O perfil dos pacientes atendidos no Centro de Tratamento de Queimados do Instituto Dr. José Frota (CTQ-IJF) em Fortaleza, Ceará, assemelha-se ao nacional, sendo a maioria das queimaduras ocasionadas por exposição à água fervente, ao fogo ou a objetos aquecidos. Estima-se que são atendidas cerca de 6.000 pessoas queimadas por ano no CTQ-IJF, sendo cerca de 10% destas internadas com queimaduras graves ou por apresentarem risco de morte (ROCHA *et al.*, 2007; LIMA JÚNIOR *et al.*, 2014).

### 3.2 Fisiopatologia das queimaduras

O Homem deve sua existência em grande parte aos mecanismos de auto reparação e preservação tecidual adquiridos através de um longo processo evolutivo. Neste processo, os mecanismos benéficos foram codificados e incluídos no genoma humano, enquanto os não benéficos foram sendo descartados ao longo de múltiplas gerações. Tais mecanismos reparativos permitiram às pessoas resolver seus ferimentos e perpetuar-se como espécie, mesmo antes da ressuscitação volêmica intravenosa e do surgimento dos modernos antimicrobianos, curativos ou cirurgias avançadas (KAMAMOTO, 2007).

Como já referido, a exposição ao calor de maneira direta (fogo/chamas) ou indireta (objetos ou líquidos aquecidos) são a maior causa de queimaduras em todo o mundo. A energia térmica ou calor é uma manifestação da energia cinética molecular aleatória. A energia térmica é transferida de moléculas de alta energia para as de baixa durante o contato através de um processo chamado condução de energia. Ao se observar o efeito do calor em uma célula, deve-se levar em conta a temperatura em si e o tempo pelo qual ela é mantida (MORITZ; HENRIQUEZ, 1947).

Os primeiros estudos experimentais demonstraram que a desnaturação ou quebra protéica acontece a temperaturas entre 40 e 44°C, ocorrendo disfunção celular, aumento do sódio intracelular e edema celular concomitante (MORITZ; HENRIQUEZ, 1947). Existe um efeito sinérgico entre a duração do contato e a temperatura. Assim, ocorre necrose celular após 1 segundo de exposição a 69°C ou após 1 h à temperatura de 45°C. Posteriormente, mostrou-se que também ocorre liberação de Radicais Livres de Oxigênio (ROS, na sigla em Inglês), quimiocinas e cininas que podem causar dano adicional à membrana celular. Se a célula é rapidamente resfriada, o dano pode ser reduzido, com o benefício adicional de

minimizar a dor (MORITZ; HENRIQUEZ, 1947; RAINE *et al.*, 1981; VENTER *et al.*, 2007).

A injúria térmica cutânea elicit duas respostas do organismo: local e sistêmica (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004).

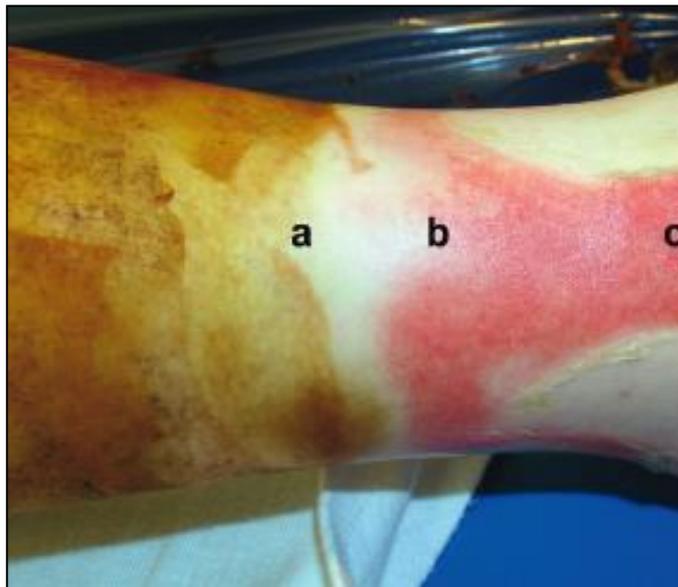
No caso da resposta local, o processo de dano inicia-se na superfície cutânea diretamente em contato com a fonte térmica, estendendo-se para as camadas mais profundas da pele ou para além destas. Jackson [1953], descreveu três zonas de lesões dispostas concêntrica e tridimensionalmente: a) zona de coagulação ou de necrose; b) zona de estase e c) zona de hiperemia (Fig. 1). Esta concepção de queimadura enunciada por Jackson ainda é válida atualmente (HERNDON, 2012).

Xu (2004), associou às zonas de lesões de Jackson três outros tipos de injúria: física, bioquímica e a resultante da rejeição ao tecido necrótico. A zona de coagulação de Jackson, mais central, caracterizada por completa obliteração dos vasos do plexo subpapilar, representa tecido imediatamente destruído por ocasião da injúria física e, dependendo da magnitude do trauma, leva à necrose de coagulação dos constituintes protéicos, lesão tissular maciça e formação de produtos de degradação tecidual. A zona de estase circunda à área de necrose e é mais profunda que esta. Nela existem ainda células viáveis e, por volta de 1h após o insulto térmico, ocorre trombose progressiva dos vasos adjacentes à lesão inicial, com isquemia progressiva, aporte de citocinas e quimiocinas com resposta inflamatória e edema exuberantes, podendo esta zona tornar-se necrótica dentro de 48-72h (fase de injúria bioquímica) ou tornar-se hiperêmica se o processo retardar-se em 16-24 h, resultando em áreas menos de menor injúria (ZAWACCI, 1974a). Na zona de hiperemia, mais periférica, a microperfusão vascular encontra-se aumentada, em função da liberação dos mediadores inflamatórios, dilatação dos vasos de resistência, aumento da pressão de filtração capilar e da atividade osmótica extravascular, com conseqüente incremento da permeabilidade microvascular a macromoléculas, ocorrendo rubor, calor e edema (ARTUSON; JONSSON, 1979; LUND *et al.*, 1989; KURODA *et al.*, 1997; HERNDON, 2012).

Como estas zonas são tridimensionais a ferida inicial pode progredir em profundidade e extensão com eventual aumento da perda do envelope protetor do corpo num período relativamente curto de 12 a 48 horas (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; HERNDON, 2012; XU, 2014). Tentativas de evitar a progressão

estase->necrose estão em curso com a utilização de derivados da eritropoetina (SCHWACHA *et al.*, 2010; SINGER *et al.* 2010; BOHR *et al.*, 2013).

**Figura 1** – As três zonas de injúria de Jackson em uma queimadura do tornozelo: a) zona de coagulação; b) zona de estase e c) zona de hiperemia (Adaptado de Herndon, 2012).



Ainda no que diz respeito à resposta local, convém destacar as alterações no fluxo sanguíneo que são cruciais à cicatrização/reparo de queimaduras. Foram descritos a aglutinação de hemácias e plaquetas, adesão leucocitária à parede dos vasos e a liberação de substâncias vasoativas (ARTURSO; WALLENIIUS, 1964; OLLOFSSON *et al.*, 1973; MULLIGAN *et al.*, 1994).

O efeito vascular benéfico do resfriamento e de várias drogas têm sido descritos. Raine e colaboradores (1981) relataram que queimaduras resfriadas em até 30 minutos após o evento apresentaram melhor reparo cicatricial que queimaduras resfriadas 1h após a mesma. Noble e colaboradores (1977) mostraram que a heparina era benéfica quando administrada antes da queimadura. Por sua vez, Ehrlich (1984) mostrou que ibuprofeno e imidazol inibiam a oclusão microvascular quando administradas até 6 horas após a queimadura, por meio da inibição da liberação de prostaciclina na vasculatura dérmica. Historicamente também foram estudados e relatados como benéficos os corticoides (ROBSON *et al.*, 1978), inibidores da síntese de prostaglandinas como a indometacina e o ácido acetil salicílico (DEL BACCARO *et al.*, 1978), oxigenioterapia hiperbárica

(GERMONPRÉ *et al.*, 1996), pressão negativa subatmosférica (KAMOLZ *et al.*, 2004), anestésicos locais como lidocaína e prilocaína (JONSSON *et al.*, 1998) além do betabloqueador não seletivo propranolol (ROMANA-SOUZA, 2011).

Por outro lado, efeitos negativos de drogas ou meios físicos também foram extensamente estudados. Blomgren e Bagge (1984) relataram que o pré-resfriamento ou pré-medicação com cimetidina, ketanserina, metilprednisolona ou indometacina não influenciam na formação da necrose pós-queimadura em orelhas de camundongos. Infecção e ressecamento (ZAWACKI *et al.*, 1974a), hipernatremia (KURODA *et al.*, 1997) e a aplicação sistêmica de vasoconstrictor (KNABL *et al.*, 1999a) aumentaram a profundidade das queimaduras.

Quanto à resposta sistêmica, tendo como prioridade manter a perfusão e o suprimento de energia para órgãos vitais, o organismo lesionado busca se autoreparar mobilizando os sistemas nervoso, endócrino e imune, montando a REMIT (FERNANDES, 1980; HASTINGS; KREPSKA; ROODENBURG, 2014).

Por ocasião do trauma acidental ou cirúrgico, estímulos nervosos provenientes da área lesada desencadeiam a resposta de fase aguda: ativação de mecanismos compensatórios que buscam estancar/impedir a hemorragia e controlar a volemia através das cascatas de coagulação e pró-inflamatórias, mobilizando substrato energético através da glicogenólise e gliconeogênese buscando, em última análise, reparar tal área (DOLECEK, 1989; HASTINGS; KREPSKA; ROODENBURG, 2014).

A intensidade da REMIT está diretamente relacionada à gravidade do trauma ou complexidade da cirurgia. No caso da cirurgia eletiva, a REMIT pode ser modulada até certo ponto, minimizando-se o jejum e a dor, realizando bloqueio anestésico regional e cirurgia regrada ou minimamente invasiva (DOLECEK, 1989; HASTINGS; KREPSKA; ROODENBURG, 2014). Em um trauma acidental, como a queimadura, tal modulação não é possível.

O tecido necrosado pela queimadura, inicialmente estéril, pode ser colonizado pela flora endógena ou exógena, causando necrose de liquefação e separação da escara. No grande queimado com superfície corporal queimada (SCQ) >10%, a ausência do revestimento cutâneo acelera a perda de fluido corporal pela evaporação que, por sua vez, é exacerbada pela REMIT. Ocorre seqüestração de líquidos nos interstícios que provoca edema em virtude da liberação de histamina e serotonina, dentre outros mediadores. Paralelamente, ocorre a liberação exagerada

de ROS, ocorrendo também disfunção da resposta celular e humoral, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, em inglês), translocação bacteriana, sepse e falência multissistêmica, podendo culminar com a morte da vítima (ROBINS, 1990; MacINTIRE; BELHORN, 2002; GREENHALGH *et al.*, 2007).

A reparação das perdas do revestimento cutâneo ocorre através de uma sequência de eventos e processos intrínsecos complexos e interrelacionados de inflamação, hemostasia, reepitelização, angiogênese, linfogênese, formação do tecido de granulação e deposição da matriz intersticial ou extracelular (MEC) (MARTIN, 1997; SINGER; CLARK, 1999). O processo de reparo é classicamente dividido em três fases distintas e sequenciais: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelação tecidual. Estas fases se sobrepõem temporalmente e são caracterizadas pela população celular predominante (CLARK, 1996). Shaw e Martin (2009) propuseram 4 fases para a cicatrização de feridas: 1) resposta imediata, 2) resposta inflamatória, 3) proliferação, migração e contração e 4) resolução.

A resposta imediata ocorre em virtude do dano tissular, podendo ser mecânica e química, partindo de células e vasos à margem da ferida inicial. Células lesionadas e estressadas respondem ativando via sinalizadores de estresse (como SAP/JNK, p38 e DAMPs [moléculas de padrão molecular associada ao dano]) em questão de minutos, culminando em alterações na expressão gênica, metabolismo e sobrevivência celular, assim como ativação de fatores quimiotáticos para outras células (SHAW; MARTIN, 2009).

Em virtude da necessidade de estancar a hemorragia, ocorre deposição de elementos celulares e plasmáticos, ativação e agregação plaquetária, resultando em um trombo hemostático formado por uma rede insolúvel de fibras de fibrina. O trombo de fibrina, além de servir de barreira física à invasão de microorganismos, também age como matriz provisória à qual se ligam fatores de crescimento e por onde células podem migrar (NURDEN *et al.*, 2008). As próprias plaquetas ativadas são importantes fontes de fatores de crescimento, tais como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), CXCL4, BFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos), TGF $\beta$  (fator de crescimento transformador beta), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e RANTES (BAHOU; GNATENKO, 2004).

Os fatores de crescimento promovem vários efeitos no processo de reparo, como indução da angiogênese, inflamação e migração de queratinócitos e fibroblastos. As células também são banhadas por outros fatores séricos, como

interleucinas (ILs), fator estimulante de colônias (CSF), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferon alfa (IF $\alpha$ ) e outros componentes que induzem o SRF (fator de resposta sérica). O SRF se liga a genes, induzindo transcrição de genes da resposta imediata e outros genes, como *fos*, *jun* e *egr-1* e *egr-2* (genes da resposta de crescimento imediato) (SHAWN; MARTIN, 2009).

A resposta inflamatória iniciada com o vazamento passivo de leucócitos circulantes (neutrófilos principalmente) a partir dos vasos lesionados dentro da ferida, continua com uma rápida ativação de células imune residentes (mastócitos, células T e de Langerhans) que, por sua vez, desencadeia um pulso de liberação de quimiocinas, cininas e citocinas. A resposta segue com o recrutamento ativo de neutrófilos e macrófagos provenientes de vasos próximos (que acontece em minutos), orquestrada por fatores de crescimento das células residentes e do plasma e também por epítipes estranhos de micro-organismos invasores como as LPS (lipopolisacaridases). Todos estes sinalizadores desencadeiam a ativação de células endoteliais locais e expressão de selectinas. As selectinas, por seu turno, controlam o processo de rolagem e ancoragem de leucócitos à parede dos vasos e subsequente cruzamento da barreira endotelial (YUKAMI *et al.*, 2007).

Este último processo aumenta ainda mais em virtude da vasodilatação e incremento da permeabilidade vascular, desencadeada pelo óxido nítrico (NO), histamina derivada de mastócitos, ativador tissular do plasminogênio (TPA) e outros fatores (EMING *et al.*, 2007; SHAWN; MARTIN, 2009).

Os neutrófilos também potencializam o aporte de ROS que eliminam micro-organismos e restos celulares, resolvem o trombo de fibrina e a MEC provisória, assim como promovem angiogênese e reepitelização (SINGER; CLARK, 1999). No sítio da ferida, os monócitos transformam-se em macrófagos classicamente ativados (M1, pró-inflamatórios) ou alternativamente ativados (M2, anti-inflamatórios e pró-angiogênicos), atuando na limpeza da matriz, de debris e de neutrófilos gastos. Os M1 aparecem precocemente na ferida enquanto os M2 predominam em fases mais avançadas do reparo (DEONARINE *et al.*, 2007).

A fase de proliferação, migração e contração envolve as ações que visam preencher a perda de substância com novo tecido. Apesar de classicamente descrito como iniciando-se a partir do quarto dia e terminando por volta do décimo-quarto dia, na verdade este processo inicia-se poucas horas após o trauma, podendo perdurar por muito tempo, dependendo de múltiplos fatores, como idade do paciente,

tamanho e localização da lesão assim como do trofismo tissular. Uma ferida incisional em um camundongo recém-nascido, por exemplo, pode cicatrizar completamente em um dia, enquanto em humanos diabéticos e idosos o processo pode perdurar por anos (SHAWN; MARTIN, 2009).

A reepitelização da lesão é obtida a partir dos queratinócitos pela combinação de migração e proliferação celular na vizinhança. As células migrantes da epiderme avançam em conjunto após sofrerem alterações que lhes facilitam o movimento. De acordo com Nguyen e colaboradores (2000) estas células alteram as adesões célula-célula e célula-matriz para facilitar sua progressão de laminina-V e medula óssea rica em colágeno-IV para dentro e através de substratos da matriz provisória que constituem o trombo, como o colágeno dérmico e a fibronectina. As células migrantes, além de regularem positivamente a expressão de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMP), também exibem protrusões lamelares ricas em actina que facilitam a diapedese. A epiderme regenera-se a partir de células tronco ali residentes e presentes nos bulbos capilares remanescente (FUCHS, 2008; SHAWN; MARTIN, 2009).

A derme subjacente também se reconstitui. O tecido de granulação substitui o trombo de fibrina, formando-se a partir de fibroblastos que são para ali recrutados e dirigidos a partir de diversas fontes: das margens sãs, fibrócitos circulantes, células progenitoras da medula óssea e células multipotentes residentes na derme (FERNANDES *et al.*, 2004; SHAWN; MARTIN, 2009). Alguns feixes de fibras colágenas, sob influência dos fatores de crescimento (como o TGF beta-1), da MEC ou por estresse mecânico, se transformam em miofibroblastos que expressam a actina alfa do músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Existem dois tipos principais de colágeno na matriz dérmica: tipo I, com diâmetro de 1 a 20 micra e tipo III, com diâmetro de 0,5 a 2 micra. No tecido lesionado há maior concentração de colágeno tipo III em relação ao tipo I, ao contrário do integro (SINGER; CLARK, 1999; WERNER; GROSE, 2003). Em conjunto, fibroblastos e miofibroblastos atuam na contração da ferida, contribuindo para a síntese, enfeixamento e alinhamento das fibras colágenas (HINZ, 2007).

A fase de resolução do reparo é essencial na restauração da funcionalidade plena e aparência "normal" da área lesionada. Os queratinócitos migrantes e proliferantes confrontam-se, param de migrar e subsequentemente se re-estratificam. Normalmente, dentro de uma queimadura os anexos epidérmicos

não se regeneram; os vasos amadurecem até formarem uma rede funcional; a densa MEC é remodelada através de um delicado equilíbrio entre síntese, enfeixamento e degradação do colágeno; miofibroblasto entram em apoptose (HINZ, 2007; SHAWN; MARTIN, 2009). O colágeno tipo III, que até então era o mais abundante, vai sendo degradado enquanto aumenta a produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos. As fibras colágenas se organizam, passando de paralelas à superfície a entrelaçadas, realinhando-se em uma direção preferencial, diminuindo o volume cicatricial, além de conferir maior elasticidade e resistência à cicatriz (SINGER; CLARK, 1999; FERNANDES; SIGNORINI, 2008).

Nos sobreviventes de queimaduras, a regulação imperfeita do processo de reparo pode resultar em cicatrizes hipertróficas, contraturas e/ou bridas cicatriciais, e menos frequentemente, em queloides. Tais cicatrizes exibem alterações de pigmentação, vascularização, flexibilidade, sensibilidade e espessura com relação à pele não queimada, podendo ser denominadas conjuntamente como cicatrizes cutâneas pós-queimadura (CCPQ). Estas cicatrizes podem gerar sequelas orgânicas, funcionais, psicológicas e sociais de difícil solução, constituindo importante problema de saúde pública, impactando negativa e substancialmente a produtividade no trabalho, a qualidade de vida, a autoestima e a sociabilidade dos pacientes afetados, especialmente em mulheres e adolescentes vítimas de queimaduras na infância, exigindo a adoção de técnicas avançadas e, na maioria das vezes, de alto custo financeiro ou social (OLIVEIRA *et al.*, 2005; LAWRENCE; FAUERBACH; THOMBS, 2006; KLEIN *et al.*, 2011; HUNTER *et al.*, 2013; RUSSEL *et al.*, 2013).

Na sociedade atual, predominantemente urbana e economicamente ativa, na qual o bem-estar, a individualidade, a independência e a aparência exterior são extremamente valorizados pesquisas básicas e aplicadas que envolvam a avaliação e tratamento de cicatrizes estigmatizantes mantêm-se na ordem do dia (VAN LOEY; VAN SON, 2003; BROWN *et al.*, 2008; MESQUITA, 2012).

### **3.3 Classificação de queimaduras cutâneas e CCPQ**

As queimaduras cutâneas respondem por cerca de 95% dos casos atendidos e admissões em centros especializados (MONTES; BARBOSA; SOUZA NETO, 2011). Não é surpresa que a pele esteja mais exposta à queimaduras que

outras estruturas orgânicas, já que é o maior órgão do corpo humano pesando cerca de 4 Kg em adultos. A pele reveste o organismo, servindo de interface interativa e exploratória do meio ambiente, além de proteger o *milieu interne* das agressões do meio externo (GIBRAN; HEMBACH, 2000).

O sistema tegumentar é composto de duas camadas bem unidas e superpostas, a epiderme e a derme, sofrendo modificações adaptativas na sua extensão e espessura de acordo com a idade, tamanho e gênero dos indivíduos, *performance* exigida e demais condições que lhe são impostas, tais como trabalho manual, exposição solar e ao frio etc. (LAGARDE; ROUVRAIS; BLACK, 2005). O trofismo da pele também varia com o estado nutricional, níveis de hormônios, vitaminas, micro- e macronutrientes circulantes (ZAK *et al.*, 2011). Em um neonato a SCT mede cerca de 0,2 a 0,3 m<sup>2</sup> chegando a 1,5 -2,5 m<sup>2</sup> no adulto. A pele é menos espessa em mulheres que em homens, sendo muito delgada em crianças, aumentando progressivamente até a 5ª década reduzindo-se progressivamente a partir daí (SOUTHWOOD, 1955; GUYTON; HALL, 1997; SALADIN, 2001).

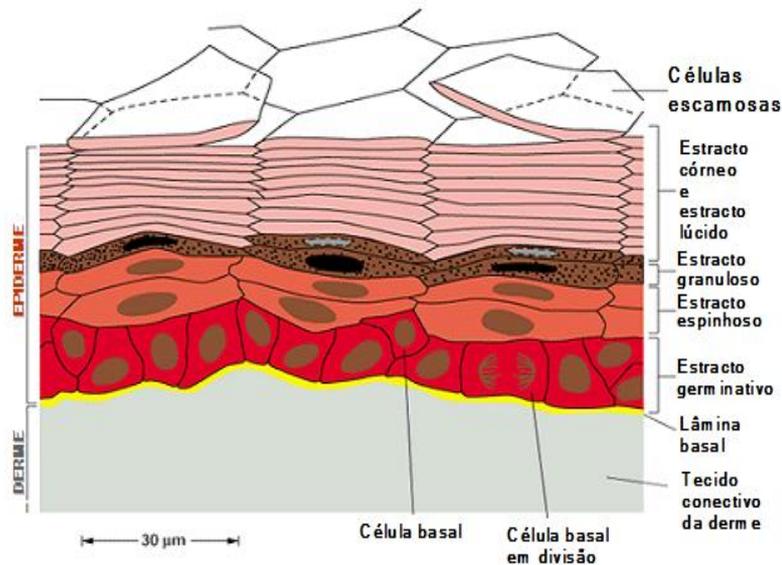
A epiderme, camada mais superficial da pele, deriva do ectoderma, sendo composta por cinco estratos de células que formam uma barreira protetora contra agressões externas, obstáculo à perda de fluidos e à entrada de substâncias e microorganismos. Sua espessura varia em diferentes partes do corpo, de 0,05 mm nas pálpebras até mais de 1 mm nas plantas dos pés (SOUTHWOOD, 1955; MEYER *et al.*, 1978; RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990).

A epiderme possui tipos celulares diversos como os queratinócitos que possuem função germinativa; melanócitos responsáveis pela pigmentação e proteção contra radiação ultravioleta; células de Langerhans possuidoras de funções imunitárias e mecanorreceptores como as células de Merckel. Tal diversidade morfológica e funcional torna extremamente difícil o design de uma pele artificial (YANNAS; BURKE, 1980; TYACK; PEGGY; ZIVIANI, 1997).

A partir da camada basal da epiderme, denominada *Estrato Germinativo*, os queratinócitos proliferam a partir dos anexos (folículos pilosos, glândulas sebáceas), tornam-se mitoticamente ativos e migram em direção ao exterior da pele, sofrem maturação neste processo e produzem as demais camadas epidérmicas: a camada logo acima da basal é o *Estrato Espinhoso*, caracterizado pela ausência de mitoses; *Estrato Granuloso*, onde predomina a produção de grânulos de queratina; *Estrato Lúcido* onde as células tornam-se anucleadas e achatadas, evoluindo para

uma camada morta chamada *Estrato Córneo*. A última camada, composta por restos celulares e queratina é compacta, impermeável e tem capacidade descamativa. O processo de maturação emergente (*bottom-up*) da epiderme dura entre 2 e 4 semanas (GUYTON; HALL, 1997; KESSEL, 1998a; SALADIN, 2001; HERNDON 2012). A figura 2 representa esquematicamente as diferentes camadas da epiderme.

**Figura 2** – Representação esquemática dos diferentes estratos da epiderme.



A derme deriva do mesoderma, podendo ser dez vezes mais espessa que a epiderme à ela associada, variando de <1mm nas pálpebras até >5mm na região posterior do tronco (HEIMBACH *et al.*, 1992). A derme está disposta imediatamente abaixo da membrana basal que a separa da epiderme, sendo formada por células primárias como os fibroblastos, produtores de fibras de colágeno e elastina, substância amorfa (gel coloidal [glicosaminoglicanos – GAGs], proteoglicanos [ácido hialurônico e sulfato de condroitina]) e outras macromoléculas similares, responsáveis pelas propriedades físicas e mecânicas da pele. O colágeno e a elastina representam, respectivamente, 75% e 4% do peso seco da pele, substância amorfa. A derme é subdividida em derme papilar (mais fina e superficial, com estrutura de fibras colágenas mais delgadas frouxamente “empacotadas”), derme reticular (mais espessa e profunda, com feixes de fibras colágenas mais grossas e adensadas) e derme justa subcutânea. A derme papilar se ancora na epiderme, sendo a porção mais biologicamente ativa da derme (PASYK *et al.*, 1989; COMPTON *et al.*, 1995). Na derme reticular estão ancorados os apêndices

epidérmicos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas), além de grande quantidade de pequenos vasos (plexo papilar), linfáticos e terminações nervosas que transmitem ao cérebro sensações tácteis, de dor, térmicas, de pressão ou vibração [REGAUER *et al.*, 1990; CROWE *et al.*, 1994; DUNNICK; GIBRAN; HEIMBACH, 1996]. Um humano adulto tem de 1,5 a 4 milhões de glândulas sudoríparas. A maioria delas são écrinas, secretam suor e estão distribuídas por todo o corpo sendo mais numerosas na região palmar e plantar. As glândulas apócrinas são menos numerosas e localizadas ao redor das aréolas, nos genitais e axilas (SOUTHWOOD, 1955; MEYER *et al.*, 1978; KESSEL, 1998a; RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990; GUYTON; HALL, 1997; SALADIN, 2001; KANITAKIS, 2002; HERNDON, 2012).

Tecnicamente falando, a hipoderme não faz parte da pele, sendo preferencialmente denominada tecido celular subcutâneo (TCSC) ou tecido subdérmico. O TCSC é formado basicamente por adipócitos e pelo plexo vascular subcutâneo, exercendo importantes funções de proteção, preservando e regulando a temperatura corporal; funções metabólicas, acumulando energia na forma de gordura além de prover suporte à derme e epiderme (BRAVERMAN, 2000; FREEDBERG, 2005).

A circulação sanguínea através da pele e TCSC tem dupla função: nutrição da pele e regulação da temperatura corporal pela condutividade do calor proveniente de estruturas internas para o meio ambiente. As células endoteliais constituem a camada íntima da parede dos vasos, desempenhando papel importante no remodelamento vascular, manutenção do tônus, fluidez sanguínea, coagulação, troca de nutrientes e desenvolvimento de órgão (FLAVAHAN, 1992).

Na derme existem dois plexos vasculares bastante diferentes. Na derme papilar a densidade de alças capilares é 12 a 14 vezes maior que na reticular: No plexo papilar existem 60-75 alças capilares/mm<sup>2</sup> com diâmetro de 10-20 micra enquanto na reticular o diâmetro dos vasos é em torno de 50 micra. Na papilar as células endoteliais das arteríolas é tipicamente recoberta com duas camadas de músculo liso enquanto na reticular existem de 4-5 camadas (BRAVERMAN, 2000; GRAFF, 2003).

Dentre as diversas funções da pele, além das clássicas acima brevemente delineadas (protetora, imunológica, homeostática/metabólica, termorregulatória e neurossensitiva) uma das mais valorizadas atualmente é a

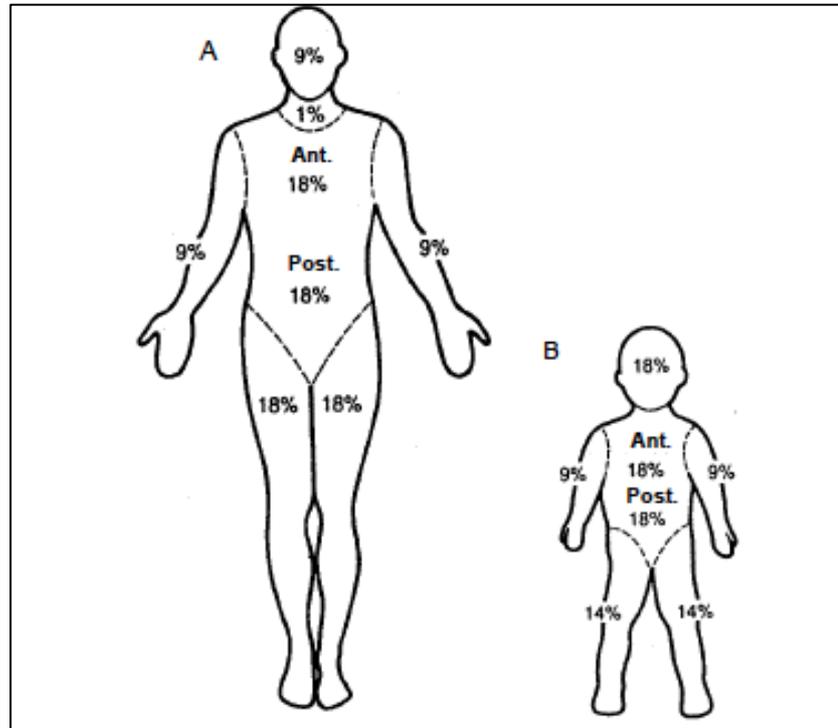
social/interativa. Quando intacta e de boa qualidade influencia na autoimagem corporal, sendo fonte de atração sexual, auxilia as relações sociais e interpessoais. Se portadora de cicatrizes exuberantes e de deformidades visíveis pode eliciar o repúdio, baixar a autoestima e a qualidade de vida do indivíduo (MESQUITA, 2011).

A queimadura cutânea pode resultar em perda da integridade da pele, estando o grau de seu comprometimento funcional diretamente relacionado à magnitude da queimadura (profundidade e extensão). De acordo com sua profundidade, as queimaduras cutâneas são tradicionalmente classificadas em quatro níveis: 1º grau (I, superficiais, restritas à epiderme); 2º grau A (IIa, dérmicas-superficiais, i.e., atingem epiderme e derme papilar, camada mais externa da derme); 2º grau B (IIb, dérmicas-profundas, lesão através de toda epiderme chegando a atingir a derme reticular e perianexial, camadas mais internas); 3º grau (III, espessura total, lesando epiderme, derme e atingindo tecido celular subcutâneo -TCSC) e 4º grau (IV, queimaduras que chegam a lesar estruturas e tecidos mais profundos como fáscias, músculos, ossos, tendões e ligamentos) (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; XU, 2014).

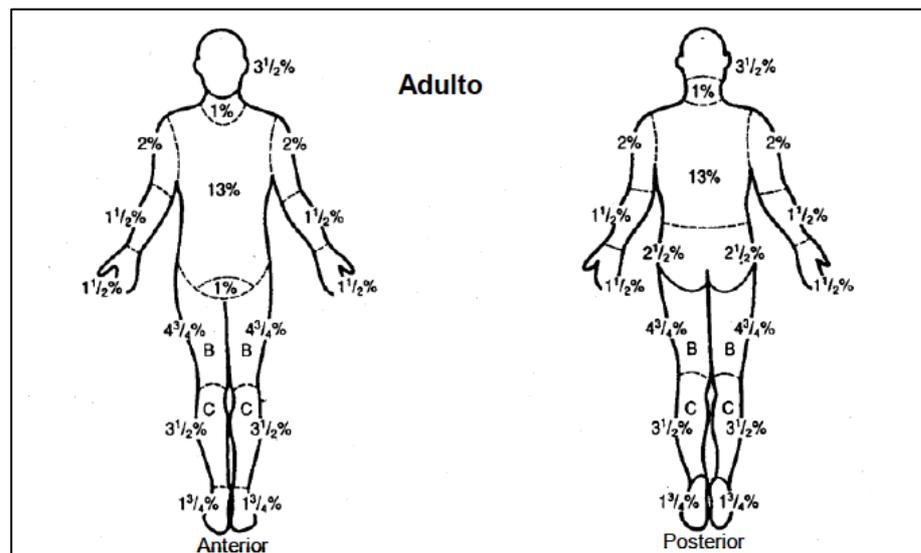
Atualmente, a classificação mais aceita é também mais simplificada, excluindo as queimaduras de 1º grau e denominando as demais como de espessura parcial, espessura total e completa, correspondendo às de 2º, 3º e 4º graus, respectivamente (DRISCOL, 2011; JESCHKE *et al.*, 2012).

A estimativa da extensão das queimaduras além de servir para determinar o prognóstico serve também determinar a fluidoterapia inicial, o suporte nutricional e, também, as intervenções cirúrgicas a serem realizadas. A respeito da extensão das queimaduras, o índice mais usado para classificá-las relaciona a ASQ com a SCT em termos percentuais, interessando apenas as de espessura parcial (segundo e terceiro graus) e de espessura total (quarto grau) havendo mapas específicos para esse fim, sendo os mais utilizados a Regra dos Nove ou Regra de Wallace (Fig. 3) e o esquema de Lund-Broder (Fig. 4), sendo este último o mais utilizado em centros especializados. As variações do percentual de área queimada pelo método de Lund-Browder segundo a faixa etária estão representadas no quadro 1 (ROBINS, 1990; JESCHKE, 2012).

**Figura 3** – Representação esquemática da percentagem de segmentos corporais nos adultos (A) e em crianças (B), segundo o método de Wallace (Regra dos Nove)



**Figura 4** – Representação esquemática da percentagem de segmentos corporais em adultos conforme o método de Lund-Browder



**Quadro 1** – Variação do percentual da superfície corpórea em função da idade de acordo com o método de Lund e Browder (1944)

Área	0-1 Ano	1-4 Anos	5-9 Anos	10-14 Anos	15 Anos	Adulto
Cabeça	19	17	13	11	9	7
Região Cervical	2	2	2	2	2	2
Tronco Anterior	13	13	13	13	13	13
Tronco Posterior	13	13	13	13	13	13
Braço Direito	3	3	3	3	3	3
Braço Esquerdo	3	3	3	3	3	3
Antebraço direito	4	4	4	4	4	4
Antebraço esquerdo	4	4	4	4	4	4
Mão direita	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Mão esquerda	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Nádega direita	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Nádega esquerda	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Genitais	1	1	1	1	1	1
Coxa direita	5,5	6,5	8	8,5	9	9,5
Coxa Esquerda	5,5	6,5	8	8,5	9	9,5
Perna Direita	5	5	5,5	6	6,5	7
Perna Esquerda	5	5	5,5	6	6,5	7
Pé Direito	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Pé Esquerdo	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

As CCPQ, a despeito de sua origem, compartilham de uma fisiopatologia que pode ser denominada de hiper cicatrização, já que surgem em decorrência de uma superprodução de colágeno durante o reparo e aparecem mais comumente quando este reparo se prolonga, estando assaz associadas à uma regulação ineficiente da apoptose das células sintetizadoras do colágeno e/ou à uma resposta imunoinflamatória exuberante que prolongam a produção/deposição do colágeno e aumentam a resposta contrátil da ferida (GANGEMI *et al.*, 2008; DOMERGUE; JORGENSEN; NOËL, 2014).

No processo de auto reparo tissular o colágeno atua controlando a migração, multiplicação e apoptose celular. Tal controle acontece por intermédio do reconhecimento do colágeno por integrinas específicas e pela transferência de sinais mecânicos através do efeito de vizinhança (LAPIERE, 2003). Na fase fibroblástica do reparo, a produção de colágeno aumenta gradativamente até a 3ª semana. Concomitantemente ocorre a remodelação tecidual que vai deste ponto e perdura indefinidamente (MARTIN, 1997). Como já ressaltado, a cicatrização/reparo de uma

queimadura, quando desgovernado por infecção, inflamação crônica, reação tipo corpo estranho ou tendência inata à fibrose ou hiper cicatrização, sem o devido contrabalanço da degradação e remodelamento do colágeno pode resultar em cicatrizes patológicas (queloides, bridas e cicatrizes hipertróficas), podendo até ocorrer degeneração maligna como na Úlcera de Marjolin (MARTIN, 1998; SINGER; CLARK, 1999; DIAZ ENCARNACION *et al.*, 2003; GRIM *et al.*, 2003; BAUK *et al.*, 2004; WYNN, 2008).

Como se sabe, o colágeno é a proteína mais abundante no corpo de mamíferos, correspondendo a 70% do peso seco da pele. Constitui, em média, 80% da derme papilar e 88,5% da derme reticular, sendo, também, o maior responsável pelas propriedades mecânicas da pele (ROCHA *et al.*, 2005). Tais propriedades mecânicas devem-se à microestrutura, organização e orientação das fibras colágenas. Assim, a análise da estrutura, morfologia, organização e dinâmica de deposição do colágeno exerce um papel central em estudos de reparo de feridas e formação da cicatriz cutânea, além de servir à avaliação de doenças dermatológicas (esclerodermia, líquen) e processos fibróticos (cirrose hepática, Dupuyetren, fibrose cística, contratura capsular etc.). De maneira geral, na pele sã, os feixes de fibras colágenas da derme (que suportam a tensão e o estiramento) são relativamente espessos e organizados tridimensionalmente numa tessitura tipo cesta de vime com fibras finas de elastina (que permitem a deformidade e o retorno da pele à sua configuração original) dispersas na MEC. Nas CCPQ, as fibras de colágeno são em geral mais espessas, estando dispostas paralelamente à epiderme (LEE; CHO, 2005; LEE; YANG, 2009; ALMQVIST *et al.*, 2009; MESQUITA, 2010).

No estudo das CCPQs muito resta a ser desenvolvido, tanto no campo de pesquisa básica, buscando-se uma melhor compreensão de sua fisiopatologia, quanto a nível clínico, no que diz respeito à otimização ou desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Neste sentido, faz-se necessário, três elementos fundamentais: 1) um modelo de queimadura capaz de mimetizar a contento as diversas fases de sua cicatrização; 2) uma modalidade terapêutica que consiga minimizar as potenciais cicatrizes desfavoráveis e 3) um método analítico capaz de interpretar e quantificar o processo reparatório/cicatricial e a eficácia da terapêutica instituída.

### 3.4 Modelos de queimadura

Cicatrizes hipertróficas e queloides inexitem, virtualmente, em outras espécies animais que não a humana. Portanto, a espécie humana seria o modelo teórico “ideal” de CCPQ. Entretanto, pesquisas *in anima nobile* sofrem uma série de restrições éticas, devendo obedecer/respeitar os princípios da autonomia, beneficência, não-maleficência, justiça e equidade, além de levar em conta questões técnicas, como a necessidade de formar uma amostra significativa com grupos idênticos independentes, condução de estudos placebo-controlados ou de não-intervenção, resolver questões de randomização, da pouca disponibilidade de pele excisada, da variabilidade de gênero, idade e da fonte doadora para estudos *ex-vivo* etc. (BELMONT REPORT, 1978; KOTOW, 2008; GAZE *et al.*, 2011).

Apesar das diferenças estruturais entre a pele de diversas espécies animais e a humana, a alternativa disponível atualmente e tida como padrão reside no modelo animal mamífero, seja ele de porte médio (porcos, caprinos, ovinos) ou pequeno (coelhos, porquinhos-da-índia, ratos e camundongos), já que modelos computacionais e citológicos de queimadura ainda restam por ser validados (DOMERGUE; JORGENSEN; NOËL, 2014).

O primeiro modelo animal padronizado de queimadura térmica foi desenvolvido há quase meio século (WALKER; MASON, 1968). Mais conhecido como modelo de Walker, este é um modelo murino de escaldadura por água fervente que emprega um cilindro de metal que dispõe de uma abertura que pode ser calibrada para determinar a extensão da SCQ. Dependendo do tempo de contato com a pele, é capaz de provocar queimaduras de espessura parcial (3s) ou total (10s), sendo ainda bastante utilizado em pesquisas (JONES *et al.*, 1990; STEINSTRASSER *et al.*, 2001; ULKUR *et al.*, 2005).

Outros modelos bastante utilizados envolvem o contato da pele com estruturas metálicas pré-aquecidas a 95-100°C, aplicadas sob pressão ou sob seu próprio peso, com tempo de contato e temperatura controlados, de modo a obter-se a SCQ e profundidade desejadas (BAHAR *et al.*, 2007; MESQUITA, 2010).

Apesar de sua utilidade em estudos de cicatrização cutânea, o modelo de ferida excisional em orelha de coelho não necessariamente reflete a resposta cicatricial à queimadura. Estudos recentes advogam a pele porcina, mais especificamente das linhagens *mini-pigs* ou *Red Duroc*, como modelo interessante

para pesquisa da cicatrização, sendo aclamados como boas alternativas. Pela sua disposição em mosaico, formam um tecido de granulação exuberante, com aumento significativo do número de fibroblastos, mastócitos e nódulos de colágeno, características histológicas frequentemente encontradas na cicatriz hipertrófica humana (HARUNARI *et al.*, 2006). Por outro lado, o custo elevado e a dificuldade de obtenção e manutenção destas linhagens tem feito com que pesquisadores façam uso do porco doméstico, os quais sofrem de remodelação e regressão precoce da cicatriz dita hipertrófica (DOMERGUE; JORGENSEN; NOËL, 2014). De acordo com estes pesquisadores, a utilização de implantes de tecido cicatricial humano ou xenoenxertos em camundongos *nude* seriam uma boa alternativa ao Red Duroc. No entanto, eles mesmos advertem que o uso de camundongos imunologicamente incompetentes é tecnicamente difícil, pela sua grande suscetibilidade a infecção oportunista e resposta idiossincrática a sedativos/analgésicos ou antimicrobianos resultam em grande mortalidade de indivíduos. Assim, modelos murinos de queimadura em animais *naive* imunocompetentes (ratos Wistar, camundongos Swiss e *Balb-c* etc.) permanecem uma opção custo-efetiva, sendo bastante utilizada em países emergentes e até mesmo em nações mais desenvolvidas que, teoricamente, podem contar com mais recursos tecnológicos e financeiros.

Desde os tempos do modelo de cicatrização de queimadura pioneiro, itens de destaque são a localização, quantidade, tamanho, profundidade e uniformidade da queimadura infligida buscando mimetizar a produção de cicatrizes hipertróficas, bridas ou contraturas (RAPP *et al.*, 2015). Em estudos experimentais, a maioria dos autores interessados em cicatrização opta pela realização de queimaduras de 2º grau, preservando assim o TCSC onde se situam os anexos dermo-epidérmicos necessários à produção de colágeno e reparo da ferida (DORSETT-MARTIN, 2004). Quanto à localização, quantidade e tamanho das queimaduras experimentais, a escolha faz-se grandemente em função do porte do animal escolhido e do tipo de estudo: crônico *versus* agudo; resuscitativo *versus* reparativo; observacional *versus* intervencionista; combinação de queimaduras inalatória e cutânea etc. (CUTTLE *et al.*, 2006). Quando o objetivo é induzir uma SIRS, para testes agudos, resuscitativos e/ou intervencionista sistêmico a opção recai sobre uma SCQ > 20%, de tipo IIb ou III, em geral induzida por escaldamento ou irradiação de forma a obter uma ferida contínua e uniforme. A recíproca é verdadeira: nos estudos crônicos, reparativos e/ou de intervenção localizada (SCQ <

20%, IIa/b), induzindo-se, neste caso, queimadura por contato com superfície metálica pré-aquecida, aplicada sob pressão, temperatura e tempo de contato instrumento-pele rigidamente controlados, obviamente sob anestesia e analgesia pós-queimadura otimizada e adequada à espécie de forma a minimizar/evitar SIRS (MESQUITA, 2010).

### **3.5 Terapêutica das cicatrizes pós-queimaduras**

Apesar do tratamento das queimaduras terem sido iniciados em tempos pré-históricos, ainda não foi identificada uma alternativa terapêutica única, totalmente eficaz, custo-efetiva e livre de efeitos adversos para o controle local e modulação da cicatrização de queimadura (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Assim, os ensaios terapêuticos continuam sendo uma área de pesquisa bastante enfatizada, incluindo desde o emprego de ervas medicinais de uso tópico e/ou sistêmico, uso de produtos originados de animais (xenoenxertos – pele suína e de anfíbios; gordura, líquido amniótico e placenta, ácido hialurônico, colágeno e quitosana (DAMOUR *et al.*, 1994; RABEA *et al.*, 2003) ou provenientes de insetos (mel, heparina) (MOLAN, 2001; JULL; RODGERS; WALKER, 2008; BOEKEMA; POOL; ULRICH, 2013), biocirurgia (utilização de animais como larvas de mosca-da-fruta cultivados em laboratório para debridamento de feridas ou de sanguessugas para minimizar edema e drenar coágulos), antimicrobianos (HEGGERS *et al.*, 2002; IKERSHAW; DeBOORDER; LAW, 2010), corticosteroides, anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e anestésicos locais (lidocaína), anti-hipertensivos como beta-bloqueadores não-seletivos (propranolol), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), clonidina e bloqueadores dos canais de cálcio (verapamil), insulina, anestésicos locais (lidocaína), passando pelo uso de imunomoduladores como imiquimode e antileucotrienos (montelucaste, zafirlucaste), imunossupressores (anticorpos monoclonais; anti-tnf-alfa, interferon (INF)-alfa e INF-gama); células tronco mesenquimais e adultas (TENG; HUANG; ZHANG, 2014) e substitutos temporários da pele (PHAM *et al.*, 2007; SCHWARZE *et al.*, 2008; NGUYEN; POTOKAR; PRICE, 2010), hormônio de crescimento (GH) e de fatores de crescimento do endotélio vascular e de crescimento epidérmico (VEGF e EGF respectivamente, nas siglas em inglês) (BARRIENTOS *et al.*, 2008), pomadas e dispositivos contendo íons metálicos (sulfadiazina de prata; sulfadiazina de prata

com nitrato de Cério) (QUEEN *et al.*, 1987; GARNER; HEPPEL, 2005; ALEXANDER, 2009) chegando a meios físicos como gel de silicone e hidrocoloides (MARTIN *et al.*, 2010), malhas compressivas, neuro-estimulação transcutânea, ultrassom de alta frequência, laserterapia, terapia fotodinâmica (HAMBLIN; MROZ, 2008), oxigenioterapia hiperbárica e vacuterapia, dentre outras opções possíveis (WARD; SAFFLE, 1995).

Discutir cada uma destas opções acerca de suas potencialidades, aplicabilidade, limitações, eficácia, custo-efetividade, custo financeiro e reprodutibilidade ultrapassa o escopo desta trabalho.

### **3.6 Métodos de avaliação de queimaduras**

A despeito dos enormes avanços tecnológicos, a observação clínica permanece, mesmo em centros especializados em queimaduras, o método padrão de estimar-se a profundidade e extensão de uma queimadura (HEIMBACH, 1992). Queimaduras cutâneas de espessura total, com sua aparência courácea, seca, firme e deprimida e insensível a dor com relação à pele normal adjacente não constituem um desafio ao diagnóstico clínico. Por outro lado, as queimaduras completas e as de espessura parcial impõem maior dificuldade em sua determinação. Nestas últimas, a formação de bolhas com acumulação de fluido abaixo da epiderme pode surgir imediata ou tardiamente (24-48h). Após o surgimento de bolhas e de sua remoção a pele mostra-se úmida, dolorosa e avermelhada, tornando-se pálida sob pressão (pelo retardo do reenchimento capilar). Para determinar a queimadura cutânea completa, geralmente são necessários exames complementares como ultrassonografia (US) ou ressonância nuclear magnética (RNM) (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; DRISCOL, 2011; JESCHKE *et al.*, 2012; HERNDON, 2012; XU, 2014).

Uma metodologia de análise que identifique adequadamente o nível de sucesso de uma modalidade terapêutica para cicatrizes hipertróficas e/ou contraturas pós-queimaduras é de vital importância tanto para o paciente quanto para o profissional envolvido em seu tratamento. Os focos principais são avaliação macroscópica e/ou microscópica direta ou indireta da reepitelização e migração celular longitudinal a partir das margens sãs ou transversal, como a migração

*bottom-up* (de baixo para cima) de queratinócitos, angiogênese, contração da ferida e depósito de colágeno.

Grosso modo, poder-se-ia dividir tais métodos de avaliação em subjetivos e objetivos. As técnicas atualmente disponíveis consistem em escalas analítico-visuais macroscópicas ou de imagens microscópicas, seja sob visão direta ou documentada por meio gráfico, fotográfico ou radiológico, de modo manual ou semi-automatizado. Infelizmente, a maioria destas metodologias de análise baseiam-se em critérios subjetivos, o que pode comprometer a sua reprodutibilidade (TYACK *et al.*, 2012).

No caso de escalas de avaliação clínica de queimaduras, Tyack e colaboradores (2013) fizeram recentemente uma revisão sistemática acerca das escalas mais utilizadas (VSS-*Vancouver Scar Scale*, MSS-*Manchester Scar Scale* e POSAS – *Patient and Observer Scar Assessment Scale*), analisando seus itens constituintes, características das amostras testadas e viabilidade de diversas escalas. Todas elas buscam transformar informações subjetivas em dados objetivos através de escores ou ranqueamento. Tyack e colaboradores (2013) dividiram-nas de acordo com seu propósito como sendo: a) discriminativa, quando serve para distinguir entre grupos de indivíduos; b) longitudinal, quando serve para medir alterações ao longo do tempo; c) preditiva, quando serve para estabelecer prognóstico. Os autores desenvolveram um guia para selecionar o tipo mais adequado para avaliação de CPQ para pesquisa e prática clínica, concluindo que devem ser utilizadas escalas diferentes e em conformidade com diferentes propósitos.

Quanto às metodologias ditas objetivas, partindo de modelos matemáticos com ou sem o uso de recursos computacionais utilizados para representar/medir um sistema biológico, existem duas abordagens bastante diferentes conceitualmente: o modelo contínuo assume que o conjunto de valores possa ser qualquer número real enquanto o modelo discreto limita o número de valores a um subconjunto dos números reais. No mundo físico, campos contínuos representam modelos contínuos através de uma função chamada campo contínuo (TEPOLA; KUHL, 2013). Exemplos de modelos contínuos seriam as dosagens séricas seriadas de medidores químicos como o TGF-beta ou VEGF na cicatriz ou a mensuração da densidade do colágeno em biópsias de queimaduras ou cicatrizes. Modelos discretos de avaliação se baseiam em relações simples (como o modelo binário), em interação espaço-

temporal e produzem resultados confiáveis através do uso de equações diferenciais como a Transformada Rápida de Fourier (FFT, na sigla em inglês) que, embora matematicamente complexas, podem ser introduzidas num algoritmo computacional que acelera a análise dos dados (HETTIARATCHY; DZIEWULSKI, 2004; DRISCOL, 2011; JESCHKE *et al.*, 2012; HERNDON, 2012; XU, 2014).

Embora a histologia seja considerado padrão-ouro na determinação da espessura de uma queimadura, seu uso ainda não é disseminado na prática clínica habitual. Biópsias deixam cicatrizes permanentes, tem um custo financeiro não desprezível, demandam tempo e requerem patologistas experientes na distinção de células viáveis e colágeno desnaturado. Além disso, não existe garantia que as áreas adjacentes à biópsia tenham a mesma profundidade, tornando o procedimento senão inviável pelo menos controverso (DeCAMARA *et al.*, 1982; KAUFMAN *et al.*, 1990; SINGER *et al.*, 2000; WATTS *et al.*, 2001).

Assim, diversas técnicas como a infusão do corante vital fluoresceína, azul de metileno, indocianina ou de henna, o laser-doppler e termografia, métodos colorimétricos por reflectância luminosa, US e RNM são alternativas empregadas, principalmente em pesquisas.

Kaufman e colaboradores (1990) utilizaram hena experimentalmente para demonstrar o fluxo sanguíneo para a pele. Um volume 2,5 vezes a volemia do animal foi injetado sob pressão constante de 400 mmHg de forma a encher o plexo subdérmico. Infelizmente o método carece de utilidade clínica já que todos os animais morreram durante a infusão.

Davies e colaboradores (1989) testaram clinicamente o azul de metileno associado à sulfadiazina prata. A associação aplicada topicamente causa descoloração do tecido necrótico, facilitando a sua excisão. Apesar dos autores considerarem que o procedimento é útil, ele nunca foi adotado na prática diária.

A fluoresceína injetada sistemicamente chega à queimadura através de vasos patententes, tornando-se fluorescente sob a luz ultravioleta (BLACK *et al.*, 1986). Entretanto não tem relevância clínica, pois não diferencia queimaduras de espessura parcial ou total. Por outro lado, queimaduras de espessura parcial em porcos que cicatrizaram 3 semanas após a lesão pôde ser diferenciada precocemente das de espessura total pelo uso do verde de indocianina (JERATH *et al.*, 1999).

Cantrell e Yost (1984) relataram que seriam capazes de determinar a profundidade de uma queimadura através da detecção da interface entre o colágeno

normal e o termicamente desnaturado. Para Heimbach e colaboradores (1992) tal capacidade é controversa, já que o colágeno se desnatura a 65°C enquanto as células da epiderme, a partir das quais as queimaduras são reparadas, morrem a temperaturas de 44 - 47°C, o que geraria uma superestimação da profundidade da queimadura. Por outro lado, Iraniha e colaboradores (2000) demonstraram que o uso do US sem contato, onde o *probe* era posicionado uma polegada da pele durante aproximadamente 5 segundos, foi capaz de prever a cicatrização completa de queimaduras que cicatrizaram em 3 semanas. Apesar disso, o uso do US como método não invasivo na prática clínica, no que diz respeito a queimaduras, permanece uma promessa.

Mileski e colaboradores (2003), assim como Park e colaboradores (2013) analisaram os benefícios da utilização de imagens de Doppler laser na determinação da profundidade de queimaduras como guia na decisão precoce de intervenção cirúrgica em adultos com queimaduras de espessura indeterminada. Alguns fatores de confusão, como alterações na temperatura corporal, ansiedade e elevação de uma extremidade, além da experiência do examinador tem de ser levados em conta. O grupo de Mileski (2003) buscou minimizar tais fatores realizando medidas seriadas no intuito de aumentar a acurácia do método. Por sua vez, o grupo de Park (2013) demonstrou uma fórmula preditiva para discriminar queimaduras de espessura total, sendo que o valor de *cutoff* de 150 unidades de perfusão tinha a melhor discriminação entre espessura parcial e total, com sensibilidade de 78% e especificidade de 95%.

Anthonissen e colaboradores (2013) utilizaram um dispositivo (Dermalab®) para medir a elasticidade e a perda de água transepidermica em 32 cicatrizes e em pele intacta. Existiu diferença significativa entre a pele normal e a de queimaduras que cicatrizaram espontaneamente e entre pele normal e enxertada. Entretanto, ocorreu um elevado grau de variabilidade intra- e inter-examinadores entre as diferentes mensurações, o que fez com que os autores recomendassem a obtenção de um grande número de mensurações para poder atingir uma amostra capaz de retornar valores significativa e, assim, poder fazer uma estimativa mais precisa e apropriada da elasticidade e perda de água em cicatrizes.

Contag e colaboradores (1995) desenvolveram o método de detecção de infecção por imageamento bioluminescente. Afirmaram que a técnica é capaz de monitorar *in vivo* e em tempo real o número e a viabilidade de bactérias e fungos em

feridas contaminadas. Utilizaram-se de micro-organismos modificados por engenharia genética capazes de emitir luminescência que é captada por câmaras sensíveis à emissão de fótons liberados pela enzima luciferase, calculando sua taxa de *turnover* em mamíferos de pequeno porte, geralmente camundongos ou ratos (DEMIDOVA *et al.*, 2005).

Mesquita e colaboradores (2010) utilizaram a mensuração computadorizada dos níveis de colágeno tipo I e tipo III em amostras histopatológicas de queimaduras em rato tratadas ou não com imiquimode e coradas pelo Sirius Red (vermelho da Síria), fotografadas em diversas fases de cicatrização sob luz polarizada para avaliar o grau de reparo e fibrose cicatricial. A análise da morfometria do colágeno pelo Sistema de Análise Morfométrica e Morfológica (SAMM), validado por Fehine (2006), evidenciou aumento do colágeno tipo I e diminuição do colágeno tipo III nos dois grupos. A razão colágeno I: colágeno III foi menor no grupo IMQ no D4 e D21PQ ( $P < 0,05$ ), mostrando uma ação moduladora do imiquimode, que foi capaz de diminuir o grau de fibrose e melhorar a qualidade da cicatriz resultante comparada aos controles.

Rocha (2010) utilizou o mesmo modelo de queimaduras e coloração histológica para verificar os efeitos da mitomicina C tópica. A morfometria do colágeno evidenciou aumento do colágeno tipo I e diminuição do colágeno tipo III nos dois grupos. A razão colágeno I: colágeno III foi menor no grupo IMQ em D4 e D21PQ ( $P < 0,05$ ).

### **3.7 Análise fractal na avaliação de queimaduras**

A evolução da cicatrização de queimaduras cutâneas, assim como de outros tipos de lesão em vários sistemas biológicos, apresentam um comportamento predominantemente irregular, complexo e não linear, podendo variar em diversas escalas, partindo do nível celular e/ou molecular via níveis orgânicos e tissulares chegando até o nível sistêmico, o que pode dificultar sua quantificação pela abordagem geométrica clássica, dita Euclidiana.

A Geometria Fractal, criada e difundida pelo matemático franco-americano Benoit Mandelbrot (1924-2010), faz parte, juntamente com os Sistemas Dinâmicos, da Ciência do Caos (JANOS, 2008). Os estudiosos do Caos buscam encontrar na aparente desordem e aleatoriedade dos fenômenos naturais e

biológicos, que exibem, predominantemente, comportamento não-linear e aperiódico, como por exemplo, o movimento planetário e das marés, o crescimento alométrico de cristais e o quebrar aleatório de uma onda marinha, a expressão eletrofisiológica das ondas cerebrais ou do ritmo cardíaco (GOLDBERGER; RIGNEY; WEST, 1990; MESQUITA, 2014).

Diz-se que um sistema é linear quando ele se comporta de maneira contínua e regular, sendo representado graficamente no plano cartesiano por uma linha reta. Quando não é assim diz-se que este é um sistema caótico ou não linear (TALANQUER, 2010). Duas propriedades características de um sistema linear são a independência e a proporcionalidade. Enquanto a independência diz que a resposta total do sistema é igual à soma das forças resultantes de fatores distintos, a proporcionalidade diz que a resposta à ação de cada fator distinto é proporcional ao seu valor (FADDEEV; FADDEEVA, 1981). A independência e a proporcionalidade não se aplicam à fisiologia humana, que possui sistemas inter-dependentes e dotados de elevada sensibilidade às condições iniciais e intervenientes (BACKES, 2006).

Um *Sistema* é algo formado por elementos independentes e, ao mesmo tempo, interrelacionados, compreendendo um todo unificado. De acordo com Vasconcelos (2009), um sistema fechado seria fechado aos *inputs* de matéria, mas seria aberto a *inputs* de energia, como no caso da biosfera ou de um ovo. Por outro lado, para Santaella e Vieira (2008), um sistema aberto existiria longe do equilíbrio energético, sendo porém abertos aos *inputs* de matéria, energia ou informação. Em contraposição, Edgar Morin (2008) afirma que no sistema fechado não haveria fonte energética nem material exterior a ele próprio, citando como exemplos uma mesa ou uma pedra, que está em equilíbrio com troca nula de energia ou matéria.

O termo “Complexo” tem sido genericamente utilizado para designar algumas características próprias dos objetos naturais, de populações e de séries temporais, como “regularidade”, “irregularidade”, “forma”, “comportamento” etc. Em termos formais, um sistema complexo é qualquer sistema aberto que envolve um número de elementos estruturalmente arranjados e que requer muitas escalas ou métodos de análise para uma mensuração adequada (JOHNSON, 2003; MORIN, 2008). Um sistema biológico, seria, então, considerado um sistema aberto, uma vez que tal sistema está interagindo constantemente com o ambiente, por intermédio de troca de energia, de matéria ou de informação de forma a se manter vivo

(BERTALANFFY, 2008). Conforme o exposto acima, um sistema biológico seria, por definição, também um sistema complexo, requerendo múltiplas mensurações em diferentes escalas para se analisar adequadamente as intrincadas relações entre estruturas e comportamento do sistema.

Na área médica e biológica, o estudo do Caos deu origem a novos campos de estudo e conceitos como o de *homeodinâmica*, proposto por Lawrence J. Henderson (1878-1942), em oposição ao de *homeostase*, proposto por Walter Cannon (1871-1945). A homeodinâmica encara o organismo humano como um sistema de alta complexidade que é dotado de uma variabilidade intrínseca, sendo composto de múltiplos estágios metaestáveis para vários parâmetros fisiológicos, não mutuamente exclusivos, nos quais uma transição para uma configuração mais ordenada ou menos complexa pode ser indicativa de doença (WEST, 2012). A respiração de Cheyne-Stokes, a perda da aperiodicidade do eletroencefalograma e do eletrocardiograma em algumas bradi- e taquiarritmias são bons exemplos. A análise aprofundada da Teoria dos Sistemas Dinâmicos, campo da ciência que discute analiticamente os fenômenos caóticos, difundida por Bertalanfy (2008), não faz parte desta tese.

A necessidade de um modo de classificar formas naturais ou patológicas e quantificar objetivamente suas alterações dinâmicas fez com que múltiplos investigadores adotassem a Geometria Fractal, ramo da matemática não linear, em detrimento da teoria dos sistemas complexos, considerada heterogênea, inespecífica, insuficientemente operacional e controversa (Di LEVA *et al.*, 2014).

Conforme Campbel (1997), a Geometria Fractal tem como objeto de estudo os fractais, um método relativamente novo de representação análise e de sinais, imagens e informações que exibem um padrão de comportamento mais regular dentro de um conjunto maior de dados com um padrão global aparentemente irregular.

A Geometria Fractal busca estudar as formas imperfeitas, opondo-se à Geometria Euclidiana, que se preocupa com a perfeição das formas e com o Cosmos. O perfil de uma montanha ou de uma costa litorânea, de nuvens, de estruturas cristalinas ou moleculares, além de vários processos biológicos não podem ser mensurados adequadamente pela geometria Euclidiana (MANDELBROT, 1982). Usualmente, pensa-se que um objeto natural tem uma certa forma (uma melancia, por exemplo, possui uma forma aproximada de um círculo ou oval,

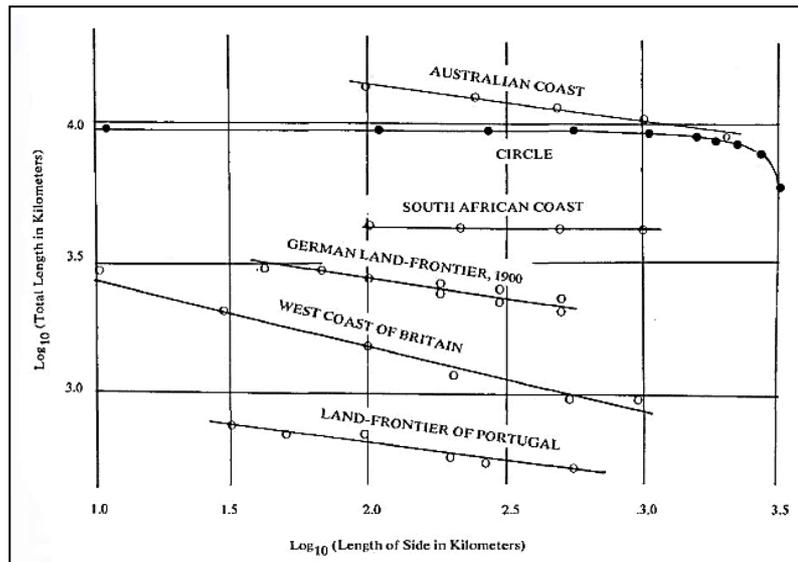
enquanto uma montanha pode ser considerada como um cone ou pirâmide truncada). Assim, determinado objeto poderia ter mensuradas algumas de suas propriedades (comprimento, área ou volume) utilizando uma resolução mais fina e detalhada que a escala característica do objeto. Este é, essencialmente, o modo Euclidiano de mensuração. Mandelbrot trouxe ao mundo a atenção para o fato de que muitos objetos naturais simplesmente não possuem estas formas pré-concebidas. Ao contrário dos regulares sólidos Euclidianos, os objetos naturais se caracterizam pela complexidade, irregularidade e rugosidade da forma, sendo necessária uma nova Geometria (MANDELBROT, 1982; Di LEVA *et al.*, 2014).

Benoit Mandelbrot (1967) desenvolveu os conceitos da Geometria Fractal baseando-se nos trabalhos pioneiros de Jules Henri Poincaré (1854-1912), de Georg Ferdinand Ludwig Philipp Cantor (1845-1918) e Lewis Fry Richardson (1881-1953). Estudando formas patológicas ditas “monstros matemáticos”, incapazes de serem classificadas nos moldes da geometria Euclidiana, criadas por matemáticos como Cantor, Niels Fabian Helge von Koch (1870-1924), Giuseppe Peano (1858-1932), Wacław Sierpinski (1882-1969) e Gaston Maurice Julia (1893-1978), Mandelbrot introduziu o termo fractal para descrever estes “monstros”, estendendo-o a quaisquer estruturas que exibem padrões ou contornos irregulares ou rugosidade que se repetem à medida que se aumenta a magnificação (MANDELBROT, 1975). O próprio Mandelbrot dizia que cunhou o neologismo “fractal” a partir da raiz latina *fractus* e do verbo francês *frangere*, o primeiro significando ‘fração’, ‘fragmento’, ‘irregular’ e o segundo quebrar ou fragmentar, empregando o termo pela primeira vez em seu livro *Les Objects Fractals: Forme, Hasard et Dimension* (1975) e, subsequentemente, em *The Fractal Geometry of Nature* (1982). Atualmente se reconhece que a rugosidade (*roughness*) é a propriedade mais importante de todos os sistemas anatômicos, sendo fortemente influenciada pelo seu comportamento e pelas diferentes relações com os componentes envolvidos (Di LEVA *et al.*, 2014).

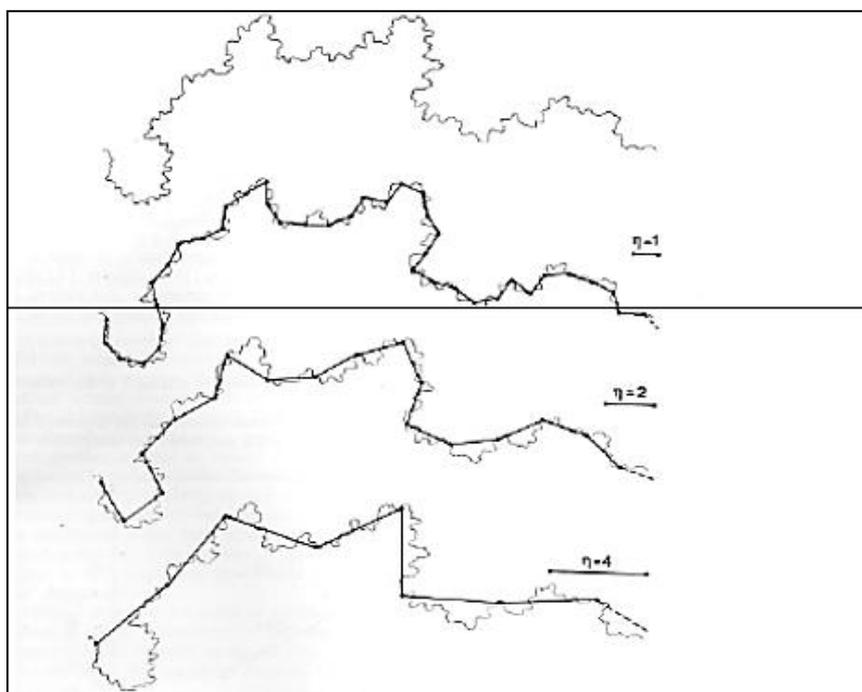
Mandelbrot (1982) cita a análise de Richardson da extensão das fronteiras comuns e da costa de diversos países. Richardson constatou discrepâncias de valores em torno de 20%, atribuindo-as ao uso de diferentes escalas ou métodos de mensuração. Um decréscimo na escala utilizada levaria a um aumento não-linear no comprimento das fronteiras ou costas, ou seja, o fato de aumentar a precisão do instrumento de medida não melhoraria a precisão da medição (Fig. 5 e 6). Mesmo assim a medida obtida possui sentido, já que existe

uma relação entre o comprimento do instrumento de medida e o comprimento total do objeto mensurado com tal instrumento. Este fenômeno ficou conhecido como “Efeito Richardson”.

**Figura 5** – Dados empíricos de Richardson acerca da taxa de aumento da extensão de diversas costas de países e fronteiras internacionais, medidas com réguas (escalas) progressivamente menores (Adaptado de Mandelbrot, 1982).



**Figura 6** – Demonstração da mudança da extensão do litoral norte da Grã-Bretanha de acordo com diversos tamanhos de segmentos de reta ou escala ( $\eta$ ) utilizados para mensuração. Adaptado de Mandelbrot, 1967.



A utilização de uma “Escala” é fundamental em pesquisas de qualquer cunho que se realize sobre o espaço físico de atuação de determinado fenômeno, espacializando a sua representação (MENEZES, 1997). Santos (1990) e Duarte (2002) definem o termo genérico *Escala* como sendo a representação convencional em um plano (mapa) que apresenta elementos do mundo real, reduzidos ou aumentados de acordo com uma proporção ou fator de escala previamente estabelecida entre as dimensões gráficas do modelo e as dimensões naturais do objeto real. Em princípio, uma escala progressivamente menor (1:1, 1:2, 1:3 ... etc.) seria menos detalhada que uma escala maior. Por outro lado, um fractal, tecnicamente falando, é um objeto que apresenta invariância na sua forma à medida que a escala sob a qual é analisada é alterada, com sua estrutura intrínseca mantendo-se idêntica à original (MIRANDA *et al.*, 2008).

Para melhor definição de escala natural (comumente utilizada em cartografia ou geografia) e escala alométrica (como a fractal, recentemente aplicada à biologia), assim como do conceito de dimensão, seguem-se algumas considerações.

A Matemática considera a dimensão zero (0) associada ao ponto, dimensão 1 associada a uma reta (ou curva), dimensão 2 associada a uma figura plana (como um quadrado) e dimensão 3 associada ao espaço (como um cubo). Postula-se que uma reta, um quadrado ou um cubo podem ser repartidos em partes semelhantes cuja junção reconstitui as figuras originais (Fig. 7).

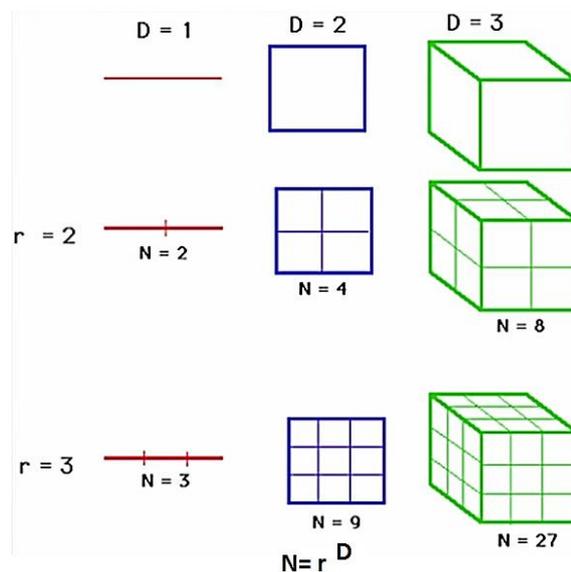
Se uma linha reta é dividida ao meio são necessários dois segmentos de reta de comprimento idêntico para sobrepor completamente a referida reta. Se esta mesma reta for dividida em três segmentos iguais são necessários três elementos e assim, sucessiva e indefinidamente. Matematicamente falando, se se tem um segmento de reta de comprimento “L”, então o número N de segmentos que cobrirão completamente a linha original é dado por  $N(L) = (1/L)^1$ .

Analogamente, ao se dividir um determinado quadrado em quadrados menores cujos lados sejam metade do lado do quadrado maior são necessários quatro destes quadrados menores para sobrepor inteiramente o quadrado original (Fig. 5). Se o quadrado maior é dividido em quadrados menores com lado igual a 1/3 do lado do maior serão necessários 9 quadradinhos para formar o quadrado original e assim sucessivamente. Assim, pode ser descrita uma expressão para o número de peças de tamanho “s” necessárias para cobrir o quadrado inicial:  $N(L) = (1/L)^2$ .

Repetindo o mesmo expediente para um cubo,  $N(L) = (1/L)^3$ . Então se a aresta do cubo menor for  $\frac{1}{2}$  da aresta do cubo maior então  $N = 8$ , se for  $\frac{1}{4}$  da aresta do maior serão necessários 27 cubos menores e assim sucessivamente.

A figura 7 ilustra a mensuração de um segmento de reta, um quadrado e um cubo utilizando uma régua ou fator de escala igual a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$  e  $\frac{1}{4}$  do tamanho, lado ou aresta de cada figura respectivamente. Também estão representados o número de elementos necessários para que cada parte fique igual ao todo.

**Figura 7** – Demonstração da Dimensão Hausdorff-Besicovitch por meio da divisão de figuras unidimensionais (reta), bidimensional (quadrado) e tridimensional (cubo) em partes semelhantes. (Adaptado de Mandelbrot, 1982)



Os expoentes 1, 2 e 3 nos exemplos acima são fundamentais para o conceito de dimensão aqui envolvido. Fica claro que o expoente de “s” é sempre igual ao da dimensão do objeto que se busca preencher (1 ou unidimensional, no caso da linha reta, 2 no caso de uma superfície bidimensional e 3, no caso de uma estrutura tridimensional (Fig. 7).

Como formulação genérica tem-se:  $N(L) = (1/L)^D$ , ou transformando

$$N_L = L^{-D}$$

onde  $N$  corresponde à quantidade de elementos iguais necessários para cobrir ou preencher o objeto original, sendo  $s$  a escala ou régua aplicada ao objeto e  $D$  a dimensão da estrutura ou objeto analisado.

Esta relação serve de base para o método de contagem de caixas ou *Box Counting* utilizado rotineiramente para determinar-se a dimensão. Transformando-se logaritmicamente ambos os lados da equação se obtém  $\text{Log}(N(L)) = D \log(1/L)$ . Em outras palavras, a dimensão  $D$  pode ser estimada plotando-se  $\log(N(s))$  contra  $\log(1/s)$  resultando em uma reta cuja inclinação corresponde à Dimensão Hausdorff-Besicovitch, que se não é um número inteiro diz-se que é uma dimensão fracionária ou fractal (DF). No caso de um plano, um fractal tem valores  $1 \leq D \leq 2$ . Nas estruturas euclidianas, pode ser afirmado que o tamanho do objeto ou estrutura analisada permanece o mesmo, independentemente da régua ou escala utilizada, sendo a sua dimensão  $D$  um número inteiro. No caso de fractais, nem sempre pode ser afirmado o mesmo. Como explicitado anteriormente, a grande maioria das estruturas da natureza são ditas Fractais.

Os fractais, conforme demonstrado por Mandelbrot (1967; 1982) e corroborado por Falconer (2005), seguem uma escala diferente da dita “natural”. Ao contrário de uma forma euclidiana, como a circunferência, que parece perder a sua curvatura à medida em que ampliamos uma das suas partes, um fractal é um objeto que não perde a sua definição formal à medida que é ampliado ou diminuído (i.e, aplicação de um fator de escala), mantendo estrutura idêntica à original, a chamada invariância da forma (ASSIS *et al.*, 2008).

Basicamente são conhecidas duas categorias de fractais: 1) os geométricos ou matemáticos, ditos *exatos*, no qual o padrão se repete com extrema precisão, ou 2) os naturais ou aleatórios, ditos *estatísticos*, nos quais as qualidades estatísticas se mantêm à medida que a magnificação é aumentada, parecendo similares e não exatamente iguais à figura inicial (FAIRBANKS; TAYLOR, 2011).

Fractais também podem ser subdivididos em espaciais ou temporais. Os *espaciais* são encontrados em estruturas físicas como nuvens, montanhas ou árvores, enquanto os fractais *temporais* são padrões fractais encontrados geralmente em séries temporais como gráficos de oscilação da bolsa, tábuas de marés, eletrocardiogramas e encefalogramas (GOLDBERGER *et al.*, 2002; FAIRBANKS; TAYLOR, 2011).

As estruturas naturais e biológicas se aproximam da idealização matemática de fractal. Estudos diversos tem identificado estruturas fractais em muitos processos naturais e fisiológicos. No corpo humano, o padrão de crescimento e distribuição de neurônios, da ramificação da árvore e vascularização traqueo-

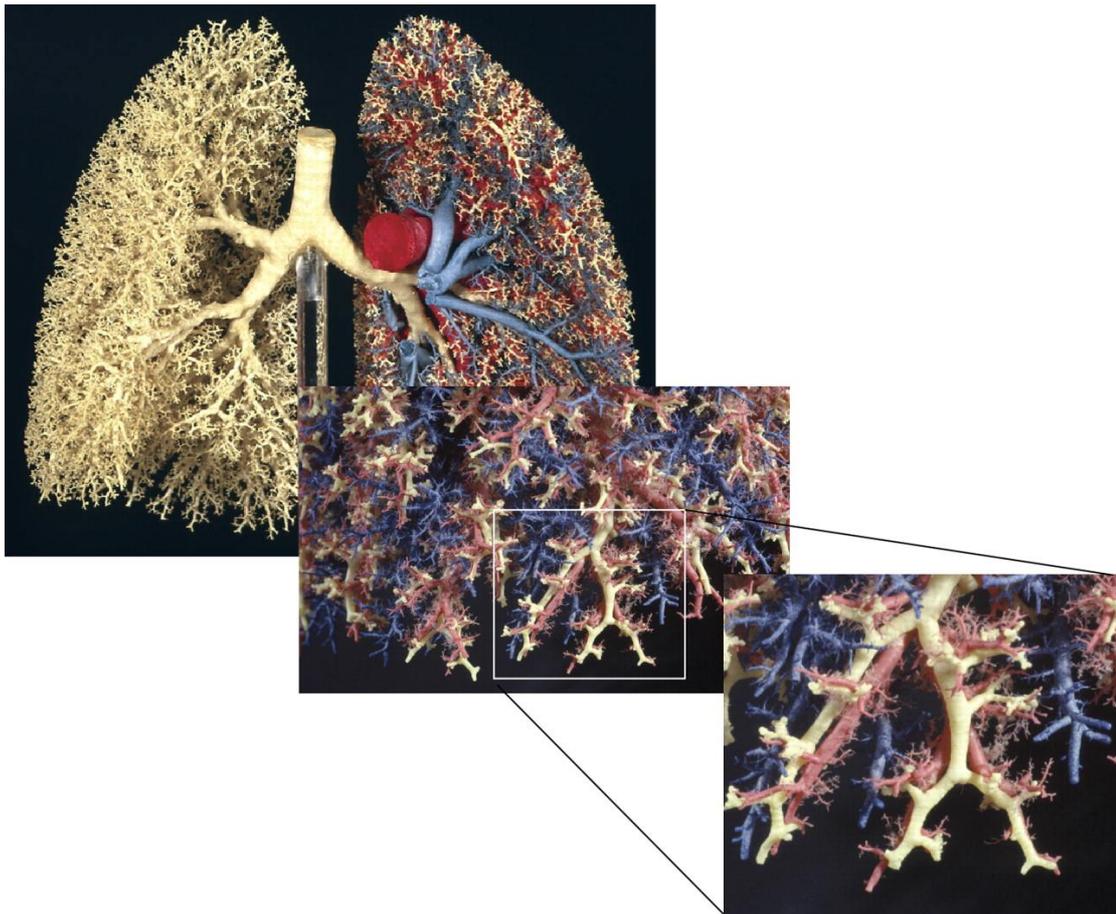
brônquica, o padrão dos movimentos sacádicos e piscadelas dos olhos, frequência cardíaca, assim como o padrão da ramificação vascular renal ou coronário exibem formato de estruturas fractais (MANDELBROT, 1982; CASERTA *et al.*, 1990; GOLDBERGER *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2011).

Moon e colaboradores (2014) explicam a prevalência de fractais na natureza como sendo devido, pelo menos em parte, a propriedades funcionais favoráveis resultantes da repetição de estruturas. As propriedades fractais dos neurônios facilitariam conexões com neurônios vizinhos (CASERTA *et al.*, 1990; KISELEV *et al.*, 2003). O padrão fractal dos movimentos sacádicos do olho tem sido explicados como características evolucionárias vantajosas que permitem aos animais cobrir visualmente uma grande área rápida e eficientemente (MOON *et al.*, 2014). Mandelbrot (1982) afirmava que a ramificação fractal da árvore traqueo-brônquica (ATB) gera uma grande área (estimada como sendo do tamanho de um campo de futebol) para maximizar as trocas gasosas. A divisão da ATB e dos vasos que a acompanham segue um padrão de organização recursivo e estatisticamente auto-similar em diferentes magnificações até alcançar um determinado limite de escala, ou seja o tamanho da hemácia, no caso dos vasos e o volume de muco, no caso da ramificação brônquica (LEFEVRE, 1983; WEST; GOLDBERGER, 1987).

Glenny (2011) avançou na proposta inicial de Mandelbrot [1982] e de Weibel (1963, 1991 2009), acerca da fisiologia e do processo de ramificação brônquica e vascular pulmonar, buscando integrar os conceitos de fractais, de evolução e comportamento emergente (desenvolvimento *bottom up*). As árvores pulmonares, que se iniciam a partir de um único tronco, sofrem divisões e ramificam-se consecutivamente em estruturas complexas com ~ 70 milhões de arteríolas pré-capilares, 480.000 alvéolos e 280 bilhões de segmentos capilares (WEIBEL, 1963). Estruturas emergentes surgem de um número limitado de forças que interagem entre si para produzir padrões e estruturas reconhecíveis, como dunas e flocos de neve. Para Glenny (2011), estes padrões não tem sido previstos pelo conhecimento anterior de detalhes das forças individuais. Somente através de interações complexas e inicialmente inesperadas é que a estrutura emerge. No caso das vias aéreas e vasos pulmonares de mamíferos, elas são determinadas por poucas proteínas. No caso de uma estrutura final formada por este processo emergente na natureza, como na ramificação de raízes e galhos em plantas e árvores, ou como no caso dos pulmões, as vantagens evolucionárias apodem reforçar o desenvolvimento

destas estruturas através de codificação genética. Assim, o autor considera mais apropriado considerar a árvore traqueobrônquica e vascular pulmonar com resultante de um comportamento emergente-adaptativo. A ramificação brônquica e vascular pulmonar estão representadas na figura 8.

**Figura 8** – Ramificação brônquica e vascular pulmonar. Um exemplo de objeto fractal natural (Adaptado de Weibel, 2011).



Em termos matemáticos, as três propriedades fundamentais de um fractal  $F$  são a auto-semelhança, a complexidade infinita e a sua dimensão:

- 1) Auto-semelhança: simetria através das escalas ou invariabilidade da forma independentemente de seu tamanho. Significa que, no plano, ângulos correspondentes devem ser iguais e os segmentos de curva (ou reta, que são um tipo especial de curva) que o compõem devem ter todos os mesmos fatores de redução ou ampliação (fator de escala).

- 2) Complexidade infinita prende-se ao fato de o processo gerador dos fractais ser recursivo (em matemática, um processo recursivo é aquele que quando realizado, encontra-se como sub-procedimento aquele anteriormente executado, seguindo um método ou função matemática, fornece um resultado parcial que alimenta o turno seguinte do processo) e iterativo (repetição de ações) *ad infinitum*.
- 3) Dimensão fractal (DF) não necessariamente inteira, dita fracionária (não integral) ou ainda, dimensão Hausdorff-Besicovitch (também chamada de dimensão de capacidade), que é estritamente diferente da dimensão topológica (GULICK, 1992). A dimensão de um fractal representa o grau de ocupação deste no espaço que o contem, servindo como medida da irregularidade (ou rugosidade [*roughness*, em inglês], como prefere Mandelbrot) de um sinal, imagem ou conjunto de dados (MANDELBROT, 1983).

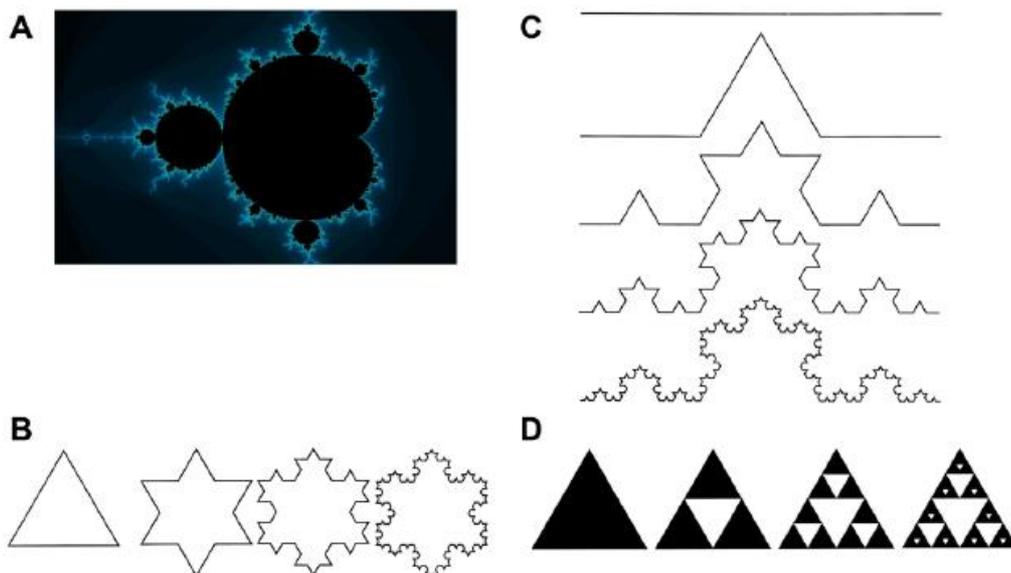
Exemplos de fractais matemáticos bastante familiares podem ser visualizados na figura 7, onde estão representados: a) o conjunto de Mandelbrot (1929-2010), fractal altamente complexo, apesar de ser construído a partir de uma formulação genérica simples; b, c) a Curva (Dimensão Fractal ( $D$ )  $\sim 1,26$ , maior que uma linha e menor que a de um quadrado) e o Floco de Neve concebidos e descritos em 1904 pelo matemático Niels Fabian Helge von Koch (1870-1924) e d) o Carpete de Sierpinski, descrito por Waclaw Sierpinski que possui  $D \sim 1,8928$ , se aproximando muito mais da dimensão de um quadrado ( $D= 2.0$ ) que a Curva de Koch (PETERSEN, 1988; Di LEVA *et al.*, 2014).

Uma curva como a de Koch, construída a partir da retirada de 1/3 central de forma recursiva e iterativa, contém, no limite, um número infinito de “dobras” ou “rugosidades” que quando ampliadas continuam surgindo indefinidamente. O floco de neve de Koch é semelhante à curva de Koch, que se obtém partindo de um triângulo equilátero de lado 1. No meio de cada lado adiciona-se um novo triângulo com 1/3 do tamanho e assim sucessivamente. O perímetro total do contorno é  $3 \cdot 4/3 \cdot 4/3 \cdot 4/3 \dots$  infinito. Contudo, apesar do perímetro infinito, a área permanece menor que a área do círculo que circunda o triângulo original. Assim temos um paradoxo onde, uma linha infinitamente longa é rodeada por uma área finita. Uma das motivações de Koch foi mostrar uma curva que não é diferenciável, isto é, não

tem tangentes em nenhum de seus pontos (MANDELBROT, 1982; PETERSEN, 1988; FALCONER, 2003).

Outro objeto fractal surpreendente é a cesta ou triângulo de Sierpinski (Fig. 9D), que é obtido removendo-se triângulos eqüiláteros invertidos de um triângulo eqüilátero inicial (chamado de iniciador) de comprimento de lado  $L=1$ . Nele se marcam os pontos médios de um dos lados e, a partir desses pontos, é traçado um novo triângulo invertido (passo 1), resultando três triângulos iguais (áreas escuras) com lados  $l$  iguais à metade do triângulo inicial ( $L/l = 2$ ); após o segundo passo temos nove triângulos iguais com lados de  $\frac{1}{4}$  do original e assim indefinidamente.

**Figura 9** – Fractais geométricos. A) Conjunto de Mandelbrot; B) Curva de Koch; C) Floco de neve de Koch e D) Triângulo de Sierpinski.



Existem diversos modos tecnicamente distintos de se definir a dimensão de um fractal. Dois dos métodos mais conhecidos e utilizados para estimar a Dimensão Fractal  $D$  de uma forma ou imagem são o *Box-counting*, literalmente contagem de caixas e a *Mass-radius relation* (relação massa-raio).

O método *box counting* leva em conta o preenchimento do espaço, sendo o mais utilizado. Isso se deve a sua simplicidade e facilidade de implementação. Esse método consiste em sobrepor à imagem uma malha de quadrados de lado  $L$  progressivamente menores, sendo  $n$  o número de quadrados necessários para preencher ou cobrir completamente toda a forma (LANDINI, 2011). Tipicamente,

espera-se que o número de caixas necessárias para cobrir um objeto plano aumente à medida que caixas menores são utilizadas. Como demonstrado anteriormente no caso do quadrado (ver fig. 9), se o lado do quadrado menor é metade (1/2) do lado do maior o número de quadradinhos (N) necessários para preencher o quadrado original é igual a 4 quadrados, ou seja 2 elevado a segunda potência ( $2^2$ ); se o lado do quadrado menor é 1/3 do lado do maior,  $N=3^2 = 8$ , e assim sucessiva e indefinidamente, reconhecendo-se a potência de 2 como a dimensão daquele objeto, como explicitado na equação  $N=L^{-2}$  ou, na expressão genérica

$$N_L = L^{-D}$$

transformando,

$$D = \log N / \log L^{-1}$$

Se, por outro lado, ao invés de uma figura plana simples, a imagem plana é de um fractal, a equação acima continua válida, só que D não é igual a dois. O Tapete de Sierpinski, outro fractal bastante conhecido, é construído a partir de um quadrado do qual se retira o quadrado central dos nove resultantes da redução do lado em 1/3 e, para cada quadrado restante se repete a mesma operação infinitas vezes. Na figura 10 abaixo o processo foi repetido cinco vezes. Nota-se que o objeto resultante a partir do segundo passo tem, necessariamente, dimensão menor que 2, já que não preserva a área da figura inicial; porém, ocupa mais espaço que uma reta (que tem dimensão igual a 1), ou seja tem uma dimensão fracionária ou fractal (não-integral) entre 1 e 2. Ao observar-se as etapas 1 e 2 da construção do tapete, percebe-se que, ao se reduzir o lado do quadrado a 1/3 do original ( $L=1/3$ ) necessita-se de apenas oito destes quadrados menores para obtermos a figura do passo 2 ( $N=8$ ).

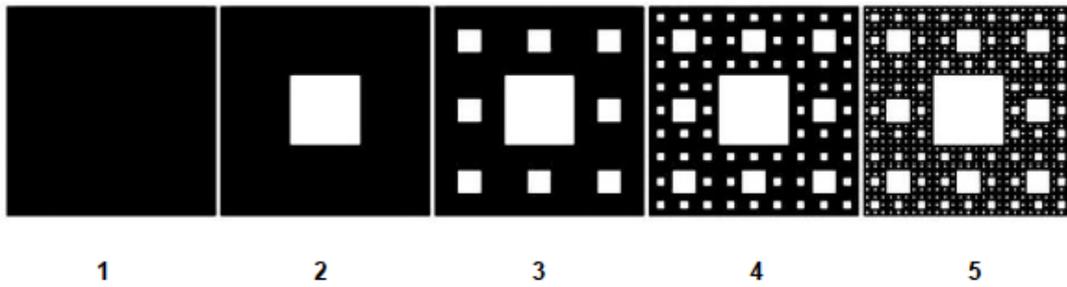
Substituindo na equação

$$D = \log N / \log L^{-1}$$

obtém-se  $D = \log 8 / \log 1/3^{-1}$

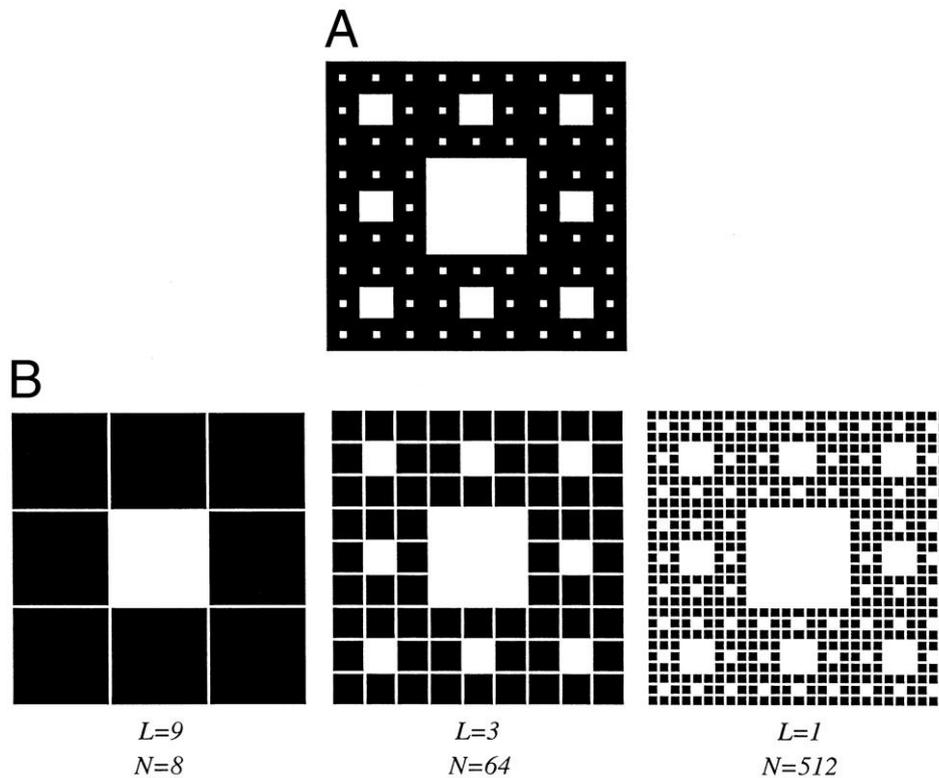
ou  $D = \log 8 / \log 3 \cong 1,8927$

**Figura 10** – Construção do Tapete de Sierpinski



O método de contagem de caixas consiste em na construção de uma grade quadriculada (caixa) de modo a cobrir completamente a figura A a ser estudada. Cada quadricula é uma caixa de lado  $L$ . Utilizam-se caixas de lado  $L$  progressivamente menores e depois conta-se o número de caixas  $N$  que contenha pelo menos um ponto da figura A. Na figura 11 demonstra-se o método de contagem de caixas no Tapete de Sierpinski. O número de caixas cresce lentamente com o expoente, que é a dimensão fractal do objeto (neste caso  $\sim 1,8927$ ).

**Figura 11** – A) tapete de Sierpinski; B) cobertura do tapete de Sierpinski com caixas progressivamente menores.



Matematicamente falando, o *Box-Counting* se baseia na relação:

$$N_L (A) = u.L^{-D}$$

em que  $N_L (A)$  é o total de caixas de lado  $L$  que contenham parte da forma  $A$ . Partindo da relação, obtém-se a Dimensão Fractal  $D$  como sendo:

$$D = \lim_{k \rightarrow 0} \frac{\log nL}{\log L^{-1}}$$

Para execução do *box-counting*, define-se um conjunto  $B$  de tamanhos de lado  $k$  a ser utilizado. É padrão calcular o conjunto  $B$  com base nas dimensões da forma.

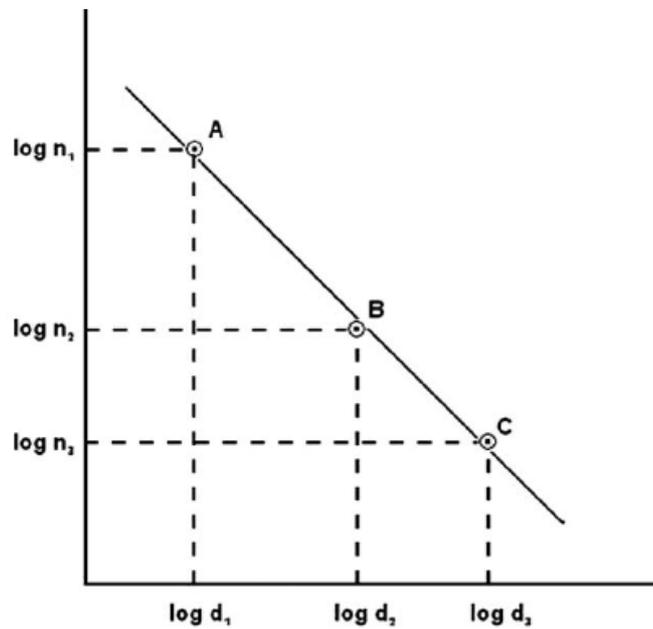
Utilizando eixos cartesianos, é traçado um gráfico bi-logarítmico em cujo eixo vertical plota-se  $\log$  de  $N_L(A)$  (logaritmo do número de caixas ocupadas) por  $\log L$  (tamanho do lado da caixa). A cada ponto das coordenadas ( $\log L$ ,  $\log N$ ) corresponde um ponto no gráfico. Espera-se que tais pontos se aproximem de uma reta com coeficiente angular  $\alpha$ . Assim, é possível definir  $D = -\alpha$  como a Dimensão Fractal do objeto  $A$  (Fig. 12, 13 e 14).

O método demonstrado é eficaz, porém consome bastante tempo quando executado manualmente e em um grande número de imagens, tendo se beneficiado e sido continuamente aperfeiçoado graças aos avanços de algoritmos matemáticos eficazes e de métodos computacionais de processamento digital e programas de análises de imagem, como o ImageJ® (disponível gratuitamente no site de internet do NIH dos EUA) que reduzem grandemente o esforço do pesquisador (MESQUITA, 2014).

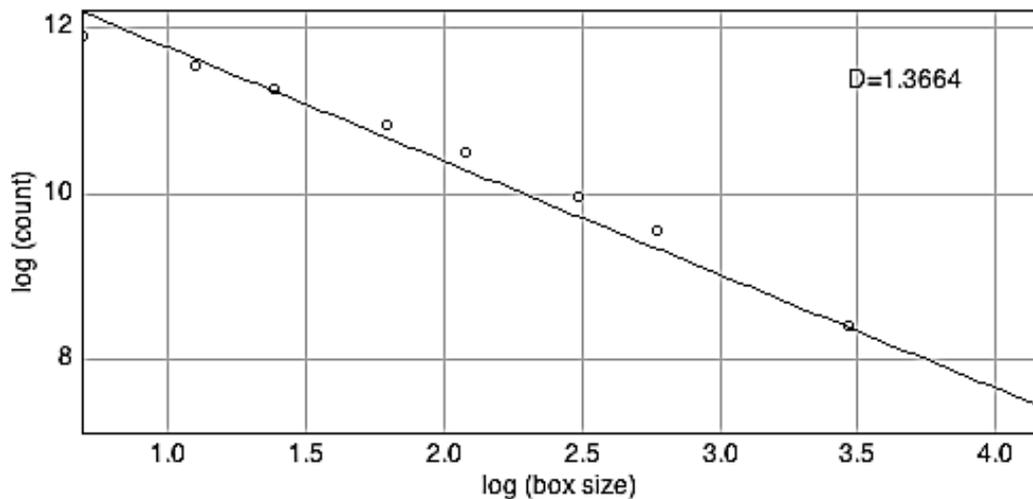
Para Baish e Kain (2000), a dimensão fractal de uma imagem pode ser estimada por várias técnicas: a) *box-counting*; b) correlação; c) *sandbox*; d) Espectro de Fourier; e) *mass-radius relation* (MSR) e outros métodos (revisados em Landini (2010)). De acordo com este autor, o método MSR é uma alternativa útil para caracterizar objetos heterogêneos, restringindo a análise a subconjuntos da imagem (ROIs) e quantificando suas diferenças nas diferentes localizações (dimensão fractal local (DFL)) em vez de computar uma DF global. A técnica MSR estima de modo ponto-ajustado (point-wise) a massa local em escala do objeto. Na MSR conta-se quantos pontos pertencem ao objeto em apreço em função de um disco ou caixa de tamanho progressivamente maior, sempre centralizado em uma origem arbitrária ao

longo do objeto (o tamanho da maior caixa ou disco define o subconjunto local). O processo é repetido em muitas outras origens. As DFLs são estimadas pela inclinação da curva da plotagem do número de pixels que formam o objeto (plotada no eixo y) versus o logaritmo do tamanho da caixa que o contem no eixo de x (Fig. 14).

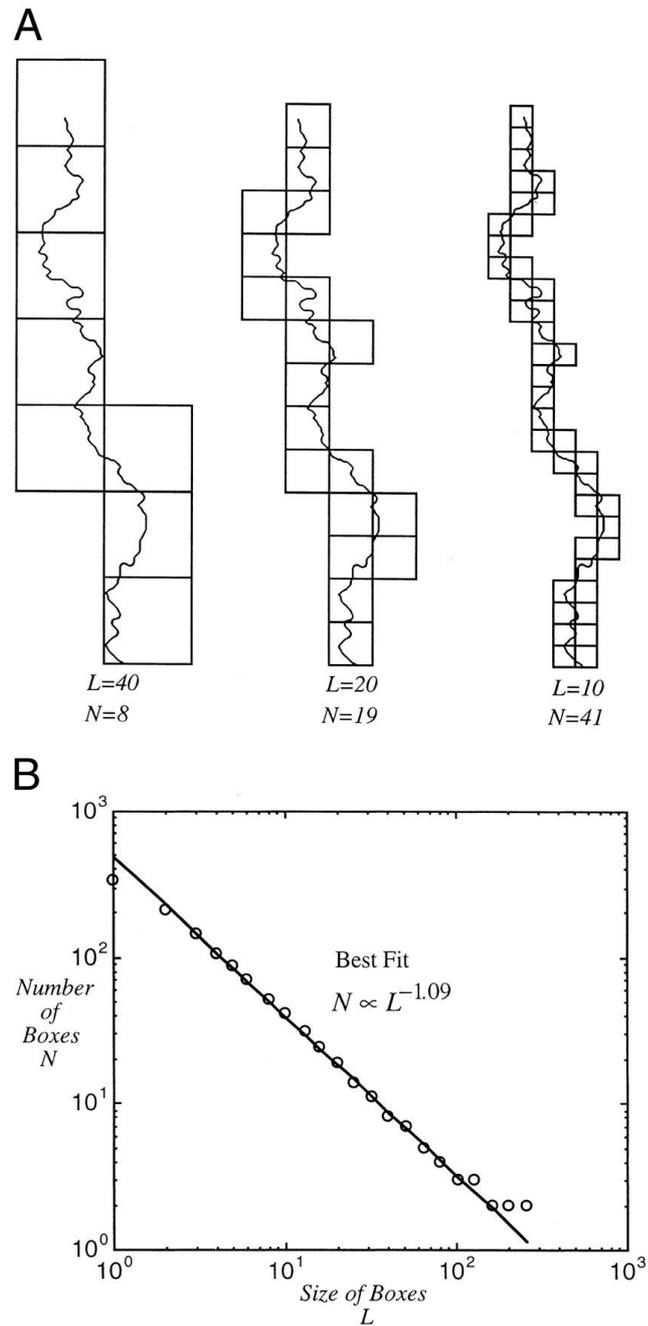
**Figura 12** – Exemplo de correlação *log-log* para estimativa da dimensão fractal pelo *Box-counting* executado manualmente (Adaptado de Guandalini, 2006).



**Figura 13** – Exemplo de correlação *log-log* para estimativa da dimensão fractal pelo *Box-counting* executada no ImageJ (Rasband, 1997-2010).



**Figura 14** – Exemplo de contagem de caixas e correlação *log-log* para estimativa da dimensão fractal da trilha mínima da vasculatura em imagem tumoral (BAISCH; KAIN, 2000).



A gama de aplicações da dimensão fractal estende-se da matemática pura (teórica) e aplicada até pesquisas biomédicas, passando pela física e química (SMITH; LANGE; MARKS, 1996).

Vasilescu *et al.* (2003) estudaram tumores gástricos, avaliando o grau de invasividade tumoral por meio da quantificação da dimensão fractal da interface epitélio maligno/estroma. Os autores encontraram que menores valores de

dimensão fractal estavam associados com maior invasividade tumoral, levando-os a concluir que a carcinogênese se caracterizaria pela perda ou diminuição da complexidade e da autossimilaridade.

Secções de biópsias de fígados de portadores de hepatite C com diferentes graus de fibrose ou cirrose foram digitalizadas e analisadas por Dioguardi *et al.* (2008). A análise da dimensão fractal mostrou que o valor absoluto deste parâmetro aumentou na dependência da extensão da fibrose (coeficiente de correlação de 0,81). Esse aumento foi atribuído à ruptura do status harmônico natural, gerando desordem na estrutura lobular do tecido hepático.

Fechine (2011) realizou análise fractal em imagens radiológicas digitalizadas de fêmures de ratos com osteoporose induzida por corticoide. A hidroclortisona induziu eficazmente osteoporose confirmada pela análise estrutural do osso usando densidade óptica radiográfica (DOR). O autor constatou valores mais elevados de dimensão fractal no grupo tratado com hidroclortisona ao final da quarta semana de tratamento.

Mesquita (2014; 2015) utilizou análise fractal e a mensuração computadorizada dos níveis de colágeno tipo I e tipo III em amostras histopatológicas de a cápsula formada em torno de minipróteses de silicone implantadas no dorso de cobaias em diversas fases de cicatrização para avaliar o grau de reparo e fibrose cicatricial, verificando a ação antifibrótica, antiproliferativa e moduladora da inflamação do betabloqueador não seletivo propranolol.

Leite Fiho (2015) testou o papel da dimensão fractal na morfometria do colágeno e avaliação de cicatrizes de queimaduras cutâneas em ratos tratados com imiquimode tópico. O autor mostrou que a dimensão fractal é uma ferramenta útil e reproduzível na avaliação da disposição das fibras colágenas em queimaduras. Valores inferiores de dimensão fractal foram encontrados nas queimaduras tratadas com imiquimode, deduzindo, portanto, que a estrutura do colágeno é menos complexa neste grupo. Houve uma maior desorganização das fibras colágenas no grupo controle.

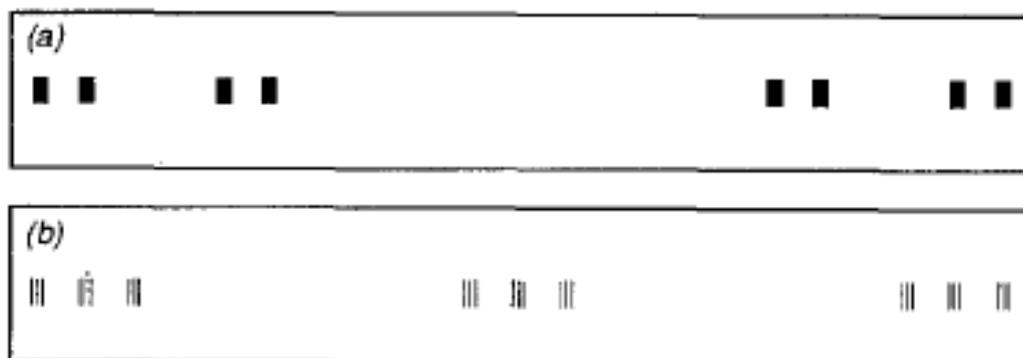
Um dos principais atributos visuais de um objeto fractal ou de uma imagem é a textura, sendo capaz de distinguir regiões e contribuir para o reconhecimento, análise, descrição e classificação de imagens digitais. De maneira geral, valores elevados da dimensão fractal indicam maior complexidade formal

daquela estrutura porém, diferentes estruturas podem possuir a mesma dimensão fractal e exibirem texturas estritamente diferentes.

O termo Lacunaridade foi introduzido por Mandelbrot (1983) para descrever características que permitam diferenciar estes objetos através à variação da distribuição espacial e dimensão de vazios (lacunas) que existem em determinado objeto ou imagem. Assim, a lacunaridade é um elemento da Geometria Fractal que serve à descrição da textura de uma imagem (ALLAIN; CLOITRE, 1991).

Poder-se-ia construir diferentes objetos fractais com mesma dimensão fractal mas que pareçam extremamente diferentes, graças à sua lacunaridade. A figura 15 (adaptada de Plotnick, Garner e O'Neill, 1993) mostra dois tipos de poeira de Cantor após três iterações que exibem a mesma dimensão fractal ( $DF = 0,5$ ) sendo  $DF = \log N / \log (1/r)$  onde em a):  $N = 2$  e  $r = 1/4$  e em b)  $N = 3$  e  $r = 1/9$ . A diferença na aparência ou textura é mensurada pela lacunaridade. A lacunaridade se baseia no grau de invariabilidade ou invariância à translação que um fractal apresenta, representando uma medida de como o espaço está preenchido. Enfim, essa ferramenta determina o quanto é homogênea ou heterogênea a textura de uma imagem (DOUGHERTY; HENEBRY, 2002).

**Figura 15** – Dois exemplos de poeira de Cantor de mesma dimensão fractal e de lacunaridades diferentes (Adaptada de Plotnick, Garner e O'Neill, 1993)



Um objeto ou imagem fractal de baixa lacunaridade é considerado mais homogêneo porque possui, em termos probabilísticos, essencialmente o mesmo o tamanho das lacunas, sendo o inverso verdadeiro (DONG, 2000; BARROS FILHO; SOBREIRA, 2008). Deste modo, a lacunaridade pode ser considerada uma medida escala-dependente da heterogeneidade da textura. Aplicações desta propriedade

podem ser úteis no processamento e análise de imagens. No caso de imagens, o atributo “textura” relaciona-se ao modo como os pixels se distribuem ou estão organizados em determinada região de interesse (ROI, da sigla em inglês para *regions of interest*) da imagem, permitindo compará-la a outras imagens (BACKES; BRUNO, 2006).

O termo “textura” refere-se diretamente às propriedades físicas apresentadas pela superfície de um objeto. Em análise de imagens diz respeito ao padrão de distribuição e organização dos tons de cinza ou de cor numa determinada área. Corresponderia à repetição de um padrão ou modelagem em determinadas ROIs, de forma exata ou com pequenas variações, fazendo da textura um excelente descritor regional de determinadas características de reflectância. Dimensão fractal e lacunaridade são medias estatísticas de segunda ordem que servem para quantificar as relações entre pixels de vizinhança (YASAR; AKGÜNLÜ, 2005).

Um dos algoritmos mais utilizados para se mensurar a lacunaridade é o Gliding-Box, similar ao algoritmo do Box-Counting utilizado para estimar a dimensão fractal (PLOTNICK *et al.*, 1996). Uma caixa de lado  $r$  é colocada no canto superior esquerdo da imagem e conta-se o número de pontos. O processo é repetido para todas as colunas e linhas da imagem, produzindo um histograma de frequência de massa da imagem. O número de caixas de lado  $r$  contornando uma massa  $S$  da imagem é designado por  $n(S,r)$  e o total de caixas contadas por  $N(r)$ . A distribuição de frequência é convertida para uma distribuição de probabilidade  $Q(S,r)=n(S,r)/N(r)$  onde:

$$Z^{(1)} = \sum_s S Q(S,r)$$

$$Z^{(2)} = \sum_s S^2 Q(S,r)$$

A lacunaridade para uma caixa de tamanho  $r$  é então definida como:

$$\Lambda(r) = Z^{(2)} / (Z^{(1)})^2$$

A lacunaridade é uma medida multiescalar, podendo obter-se diferentes valores de lacunaridade modificando-se o tamanho da caixa utilizada no *gliding-box* (PLOTNICK *et al.*, 2006). A utilização de meios computacionais de segmentação interativa e análise de imagens tem favorecido a utilização da lacunaridade como ferramenta comparativa.

A Lacunaridade foi utilizada por Dougherty e Henebry (2002) na avaliação do trabeculado ósseo em imagens digitalizadas de cortes tomográficos da coluna vertebral em pacientes portadores de osteoporose, concluindo que essa ferramenta é útil na avaliação desta afecção.

Também avaliando a osteoporose, YASAR e AKGÜNLÜ, (2005) empregaram a ferramenta na análise de imagens digitalizadas de radiografias panorâmicas de mandíbula, concluindo que o método é um bom indicador de diferenciação entre os grupos controle (normais) e testados (osteoporóticos).

A metodologia também foi utilizada pelo mesmo grupo na análise de imagens digitalizadas de radiografias panorâmicas de mandíbula, desta vez com foco na área cortical de áreas dentadas e edêntulas para acessar eventual diferença na arquitetura óssea (YASAR; AKGÜNLÜ, 2008). Os autores concluíram que as áreas desdentadas são mais homogêneas.

Por sua vez, Rabelo *et al.* (2010) empregaram a lacunaridade na análise de imagens histológicas digitalizadas de tecido ósseo, encontrando diferença significativa entre os grupos controle e teste

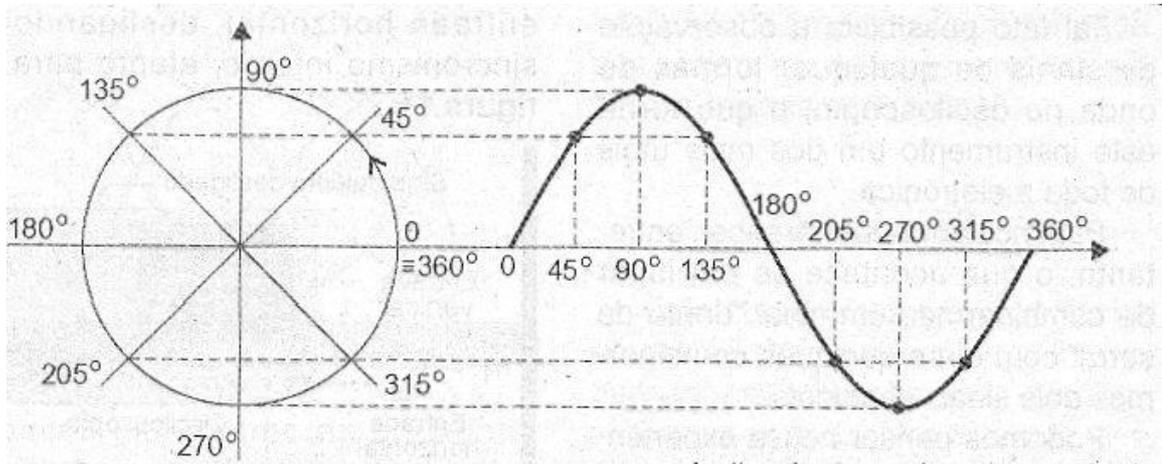
Uma imagem digital obtida de uma lâmina histológica corada pelo picrossirius red (PSR) visualizada sob microscopia de polarização serviria sobremaneira à identificação da textura daquela seção, já que o PSR realça a anisotropia do colágeno contido naquele tecido – o colágeno tipo I (maduro) ressaltado em tons de vermelho/laranja e o colágeno tipo III (jovem) em tons de verde. A lacunaridade poderia fornecer uma espécie de estimativa da textura ou “assinatura” para aquela imagem, permitindo comparações, análises e classificações.

### **3.8 Análise de imagens pela Transformada Rápida de Fourier**

Um senóide (também chamado de onda seno, sinusóide ou onda senoidal) é uma representação gráfica da projeção do movimento do ponto na circunferência sobre o eixo vertical ou eixo Y. Se se considera o valor do raio da circunferência unitário, ou seja,  $r = 1$ , essa distância (que depende do ângulo que determina a posição do ponto) variará de  $-1$  a  $+1$  e a ela pode associar-se uma grandeza denominada "seno" do ângulo, ou abreviadamente "sen". Se em toda a volta do ponto anotam-se os senos dos ângulos correspondentes a um bom número

de posições e se colocarem-nos um ao lado do outro, obtem-se uma figura ondulada, conforme ilustra a figura abaixo.

**Figura 16** – Criação de uma onda senoidal a partir de uma circunferência.



Conforme Ian Stewart (2013) a técnica de Fourier é largamente usada em processamento de imagens digitais e mecânica quântica, descobrir a estrutura de moléculas biológicas grandes como o DNA e o colágeno, compressão de dados, limpar gravações de áudio e analisar terremotos. Variantes modernas são usadas para armazenar eficientemente dados de impressões digitais e aperfeiçoar equipamentos de imagens médicas. Aggarval e colaboradores (1990) por sua vez, avaliaram os efeitos da injúria térmica na responsividade vascular da microcirculação periférica em retalho cutâneo de hamsters. Mensuraram as flutuações no diâmetro de arteríolas e vênulas antes e após queimadura superficial por intermédio da FFT, de um estimador de tendências de linhas espectrais (PSLE, na sigla em inglês) e da auto-regressão da análise espectral (AR). A FFT e a PSLE revelaram estados de baixa energia nos sinais emitidos pós-queimaduras acompanhados de uma curva tendendo a menor atividade rítmica. A FFT foi capaz de dar uma ideia da tendência enquanto a PSLE foi considerada altamente instável e dependente do tamanho da microjanela do retalho. A AR confirmou que o processo da responsividade vascular era estável, porem não eram puramente periódicos.

## 4. MÉTODO

### 4.1 Caracterização do estudo

Foram analisadas quantitativamente imagens digitais de secções histológicas obtidas a partir de amostras teciduais provenientes de queimaduras de espessura parcial em diferentes fases de cicatrização, tratadas ou não com bleomicina, selecionadas de modo aleatório e amostras de pele intacta.

O referido estudo experimental, de caráter interinstitucional, foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX) do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS) após análise e aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Protocolo 52/2011) – (Anexo A).

Os estudos animais foram estruturados nos princípios da experimentação animal, obedecendo à Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, seguindo os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

Na redação desta tese, foram adotadas as normas técnicas contidas no Guia de Normalização de Trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará (MOURA et al., 2013) e utilizou-se a nomenclatura da *Nomina Anatômica Veterinária* (ICVGAN, 2005).

Para maior clareza e entendimento dos procedimentos para a realização das queimaduras e obtenção do material para a presente análise, estes estão brevemente descritos a seguir.

### 4.2 Ambiente de experimentação

Os animais foram obtidos no Biotério da Unichristus, tendo sido submetidos a um período de aclimatação prévio de uma semana no ambiente de experimentação, o qual conta com instalações apropriadas à manipulação dos animais e a execução dos procedimentos operatórios. Antes de serem incluídos no estudo, os animais foram examinados por médico veterinário para estabelecer seu estado de saúde.

Durante todo o decorrer do experimento, os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno adequadas à espécie em apreço, provida de tampa de arame galvanizado, guarnecida com maravalha de pinus que era trocada três vezes por semana.

O ambiente de experimentação também dispunha de controle digital da temperatura, variando de 22 a 24°C com umidade relativa do ar de 65% onde os animais seguiram um ritmo claro-escuro de 12/12h, recebendo água potável e ração comercial *ad libitum*.

### **4.3. Animais**

Nos experimentos foram utilizados 54 camundongos (*Mus musculus* var. *albinus*) machos, saudáveis, adultos jovens (idade de ~ 8 -12 semanas), pesando entre 30 e 50 g.

### **4.4 Anestesia**

Após o período de aclimação proposto, cada animal foi retirado aleatoriamente de sua gaiola e procedeu-se à pesagem individual em balança de precisão (capacidade 1.500 g, incremento de 0,01 g) modelo Adventurer, Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda., São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil, regulada nos padrões do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). A pesagem foi realizada no pré-anestésico e semanalmente até a eutanásia. O peso inicial serviu para calcular a dose anestésica da medicação em estudo, enquanto o peso final permitiria avaliar eventuais diferenças de ganho ou perda de massa corpórea entre os grupos.

Após a pesagem, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) utilizando o Cloridrato de Cetamina a 5% (Vetanarcol®, König do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba-SP), na dosagem de 100 mg/kg de peso corporal, associado ao Cloridrato de Xilazina (cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina) a 2% (Kensol®, König do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba-SP) na dose de 10 mg/kg de peso vivo.

A efetividade da anestesia foi verificada de forma convencional, analisando-se a ausência de movimentação espontânea, observando-se diretamente

os movimentos toracoabdominais a ausência do reflexo córneo-palpebral (*córnea palpebrae*) e a inexistência de reação motora após preensão com pinça, do coxim adiposo de um dos membros pélvicos (*membrum pelvinum*).

Na recuperação anestésica os animais foram mantidos em ventilação espontânea e aquecidos sob a luz incandescente (100 Watts) até o completo restabelecimento dos reflexos e da livre movimentação. A seguir, cada animal foi recolocado em gaiola individual, com o intuito de evitar eventuais interferências dos outros animais como lambeduras ou mordeduras.

#### **4.5 Indução da queimadura**

Para a preparação do campo cirúrgico, foi realizada tosquia em todo o dorso dos animais, desde a região de implantação dos membros torácicos à de implantação dos membros pélvicos com aparelho de epilação elétrico. A seguir, cada animal foi posicionado em decúbito ventral com a cabeça alinhada ao tronco com os quatro membros estendidos e fixados à prancha cirúrgica (30x35 cm, protegida com campo de algodão) com o auxílio de fita adesiva.

Foi realizada degermação vigorosa e antisepsia do dorso com clorexidina degermante e alcoólica (Riohex ® 2% e Riohex ® 0,5%, Ind. Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

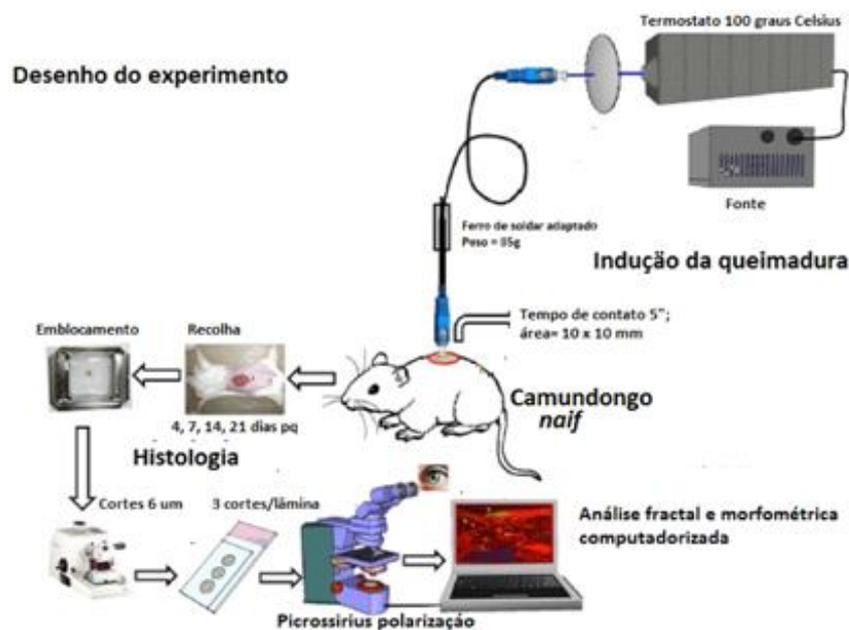
Para a demarcação da pele e guarnição do campo cirúrgico, foram utilizados materiais devidamente esterilizados: caneta dermatográfica (Accu-Line, MA, USA), um molde vazado medindo 3 x 3 cm com um quadrado central de 100 mm<sup>2</sup> cm foi preparado utilizando filme radiográfico, além de campos fenestrados (30 x 30 cm) confeccionados em algodão de alta densidade (Sol-A-Sol®, Santista).

A queimadura de espessura parcial foi realizada em 48 animais utilizando um ferro de soldar comercial (Hikari, 40W), em cuja ponta foram soldados uma placa metálica de cobre de 10x10 mm e, logo acima desta, um termistor ligado a um termostato calibrado (*dimmer*) para manter a temperatura constante de 100 °C. O equipamento com peso total de 90g foi mantido em contato com a pele do dorso sem pressão adicional que não a gravidade durante 10 segundos cronometrados, tempo suficiente para gerar uma queimadura de espessura parcial profunda, conforme modelo previamente descrito (MESQUITA *et al.*, 2010; CAMPELO *et al.*, 2011).

A área queimada total (AQT) pretendida era entre 10% e 20% da superfície corporal total (SCT), determinada de acordo com a Fórmula de Meeh-Rubner (MOSTELLER, 1987; CHEUNG *et al.*, 2009). A equação assume que a superfície corpórea é proporcional à 2/3 da potência da massa corporal:  $SCT = k \times (W^{2/3})/1000$ , onde SCT é dada em  $m^2$ , k é uma constante para a espécie sendo  $k=9,82$  para camundongos e W é a massa corpórea (peso) em gramas. Assim, no estudo foram realizadas queimaduras de  $1\text{ cm}^2$  cada, disposta a meio caminho dos membros pélvicos e torácicos na linha média dorsal dos animais.

Convém ressaltar que, para evitar variações na técnica e eventual contaminação, a equipe cirúrgica era composta de um único cirurgião, um técnico de laboratório e um auxiliar responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal. O desenho experimental está representado na figura 17.

**Figura 17** – Representação esquemática do experimento



Fonte: Autor.

#### 4.6 Divisão em grupos e tratamentos

Quarenta e oito animais submetidos a queimadura foram randomicamente alocados em dois grupos ( $n=24$  cada), sendo um grupo submetido a tratamento intralesional em dose única com bleomicina a 5% (grupo BLEO), tendo o outro grupo

de animais como controle positivos tratados apenas com SF 0,9% intralesional (SAL).

Os animais foram avaliados diariamente e fotografados nos dias 4 (D4), 7 (D7), 14 (D14) e 21 (D21) após a queimadura, ocasiões nas quais seis indivíduos de cada grupo foram anestesiado e sacrificados por deslocamento cervical.

Seis camundongos serviram como controle negativo não submetido a queimadura, sendo denominado grupo controle (CTRL). Este grupo foi seguido até o 21º dia, quando foram anestesiados, demarcados no dorso e sacrificados do mesmo modo que os animais submetidos a queimadura. Foram retiradas amostras de pele dos três grupos de animais que foram encaminhadas para processamento histológico conforme descrito abaixo.

#### **4.7 Técnica de processamento histológico.**

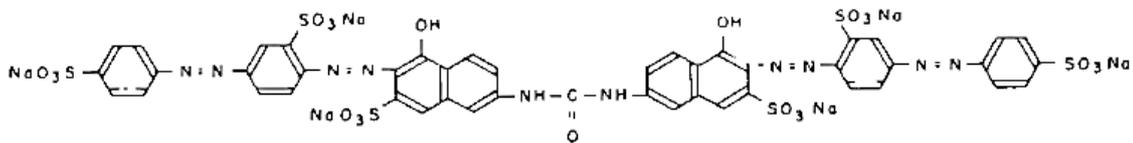
Após a eutanásia sob anestesia, nos tempos pré-determinados (D7, D14 e D21), os animais de cada grupo de estudo foram novamente fixados em decúbito ventral à prancha cirúrgica, sendo devidamente marcados (quadrados de 10 mm de lado, com 5 mm de tecido não-queimado adjacente), para a retirada em monobloco das amostras para estudo histológico, interessando os planos cutâneos e TCSC até atingir-se o *panniculo carnosum*.

A seguir, cada amostra foi novamente seccionada na área cicatricial utilizando-se lâmina de bisturi numero 11 em três cortes de 3 mm: um central e dois laterais. O tecido obtido foi devidamente marcado e acondicionado individualmente durante 24h em um volume de formol tamponado 10% em volume 10 vezes superior ao da amostra. Após a fixação das amostras em formol, procedeu-se à técnica de preparo histológico de rotina, incluindo as etapas de desidratação gradativa, diafanização, infiltração e emblocamento em parafina das amostras. Os blocos das peças (três por queimadura) foram seccionadas em cortes seriados em micrótomo rotativo com 6 µm de espessura obtendo-se, pelo menos, três níveis histológicos por bloco (9 cortes/queimadura) tomando como referência ortogonal a epiderme.

As amostras de cada subgrupo dentro de cada estudo específico foram coradas pela técnica histoquímica do vermelho de picrossírius – Sirius red, SR F3BA (Fig. 18) saturada em ácido pícrico (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

Na sequência, procedeu-se a montagem e a identificação codificada das lâminas, com fixação das lamínulas por meio de resina sintética.

**Figura 18** – Estrutura química do Sirius Red F3BA



Fonte: Junqueira e Bignolas, 1982.

A técnica do picrossirius permite a obtenção de informações acerca da densidade e do tipo de colágeno formado na cápsula pela identificação da sua birrefringência, que é a capacidade de brilhar sobre fundo escuro. No exame sob microscópio de luz polarizada o colágeno tipo I (COL-1), colágeno maduro, apresenta fibras mais espessas, aglomeradas e fortemente birrefringentes com coloração avermelhada. Já o colágeno tipo III (COL-3), imaturo, apresenta fibras mais finas, e dispersas no parênquima, fracamente birrefringentes com uma coloração esverdeada (JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979).

As imagens dos cortes histológicos foram fotografadas sob luz polarizada, utilizando-se uma câmera digital CCD Sony DSC W55 de 7.1 Mega Pixels (Sony Inc, Tóquio, Japão) acoplada a microscópio Coleman N-200/T, São Paulo, Brasil, empregando objetiva de 40X, em modo manual, ISO 100, velocidade do obturador 1/2000, abertura F 4.8 em zoom máximo, armazenadas em arquivos JPEG (2592 x 1944 pixels), escala de 2,083 pixel por micrômetro. As fotografias foram realizadas em um único dia por uma só pessoa, de forma a minimizar variações de iluminação. Dentro de cada grupo e nos devidos tempos foram selecionados aleatoriamente duas imagens por animal.

#### 4.8 Análise das imagens

Para evitar viés de seleção, optou-se por escolher como região de interesse (ROI) a totalidade da imagem. A dimensão fractal (DF) e lacunaridade (LAC) foram calculadas através dos métodos *box counting* e *gliding box* utilizando-se o programa analisador de imagens gratuito ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) junto

com o *plugin* FracLac. O mesmo programa foi utilizado para quantificar a organização do colágeno. O ImageJ consiste em um processador de imagens amplamente utilizado na literatura escrito na linguagem Java, desenvolvido por Wayne Rasband, pesquisador do Research Services Branch (RSB), órgão do NIH dos EUA.

No preparo para análise foi necessário binarizar a imagem, transformando-a em uma imagem constituída de pixels pretos (intensidade 0) em fundo branco (intensidade 255). Ferramentas técnicas de segmentação como limiarização (*threshold*) e esqueletização (*skeletonize*) da arquitetura do colágeno ajudaram a otimizar a imagem para análise. (A sequência do processo está ilustrada mais adiante). Os dados obtidos foram automaticamente organizados em planilhas eletrônicas pelo ImageJ.

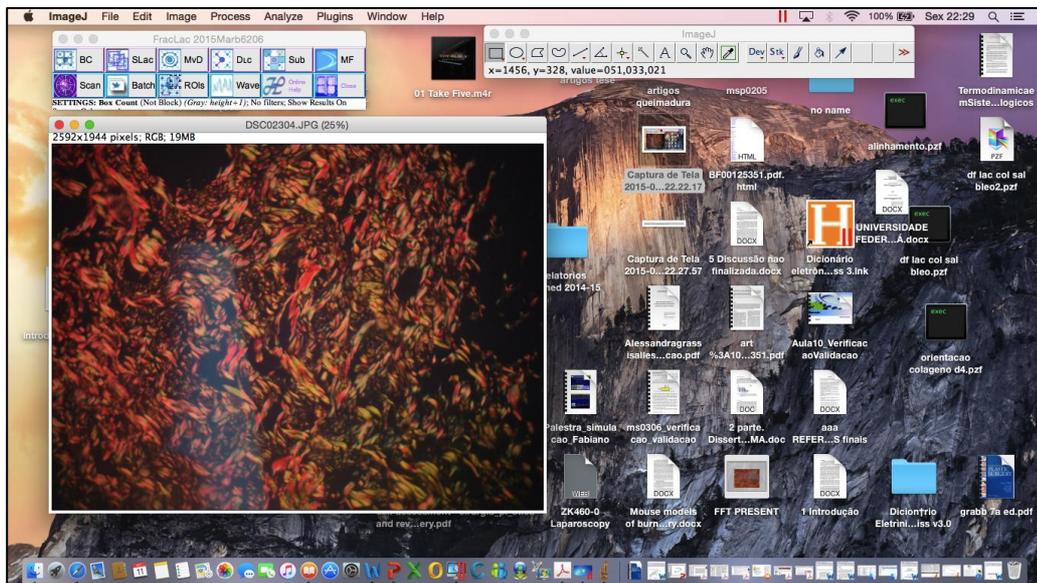
Para obter-se maior uniformidade e permitir comparações mais fidedignas, as imagens de queimaduras foram mantidas no tamanho original sendo pré-processadas e analisadas segundo os seguintes passos:

1. Importação das imagens
2. Conversão das imagens coloridas em imagens de 8 bits seguida por duplicação das mesmas;
3. Redimensionamento das imagens: Binarização da imagem
4. Mensuração da Dimensão Fractal (DF) do colágeno global (colágeno tipo I + colágeno tipo III) utilizando a ferramenta "*Fractal box counting*". (contagem de caixas, onde o tamanho do *box* aumenta progressivamente (*box*= 2, 3, 4, 8, 16, 32, 64) até cobrir as imagens selecionadas e o programa calcula a DF automaticamente)
5. Mensuração da lacunaridade (Lac) do colágeno global utilizando o método *gliding box* do *plugin* FracLac (similar ao método de contagem de caixas, onde o tamanho do *box* aumenta progressivamente e "desliza" a partir de um canto até preencher totalmente a imagem selecionada).
6. Aquisição da imagem duplicada e segmentação utilizando a ferramenta "*RGB stack*" do programa, que separa a imagem em três padrões do espectro de cor (R, red=vermelho, G, green=verde e B, blue=azul).

7. Repetição dos passos de renderização e mensuração de DF e Lac do colágeno tipo I (canal red) e colágeno tipo III (canal verde).
8. Avaliação e interpretação dos resultados da Análise Fractal por métodos estatísticos.

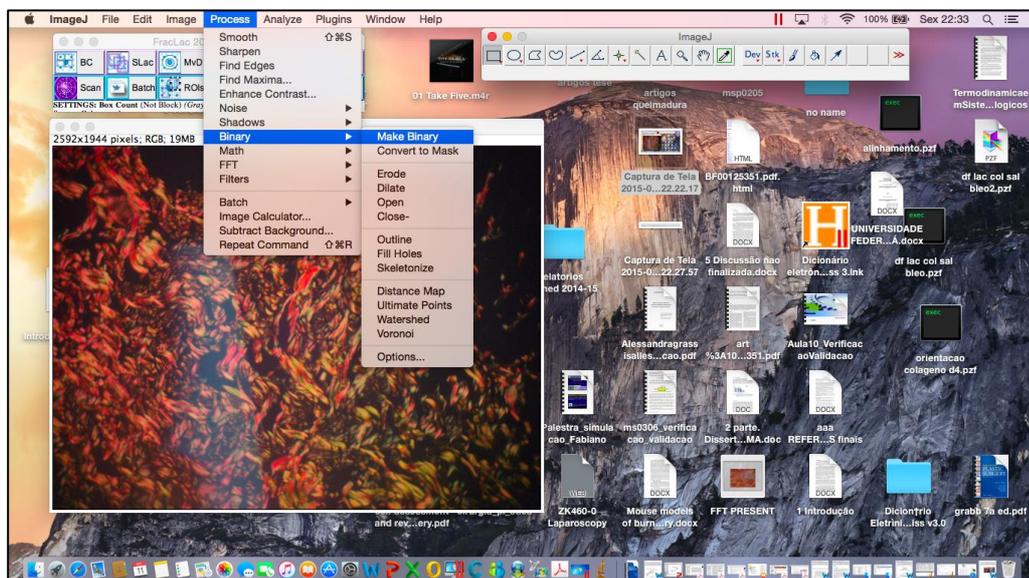
Os principais passos do processo estão representados a seguir.

**Figura 19** -- Captura da tela durante o processo de aquisição da imagem corada pelo picosirius sob polarização.



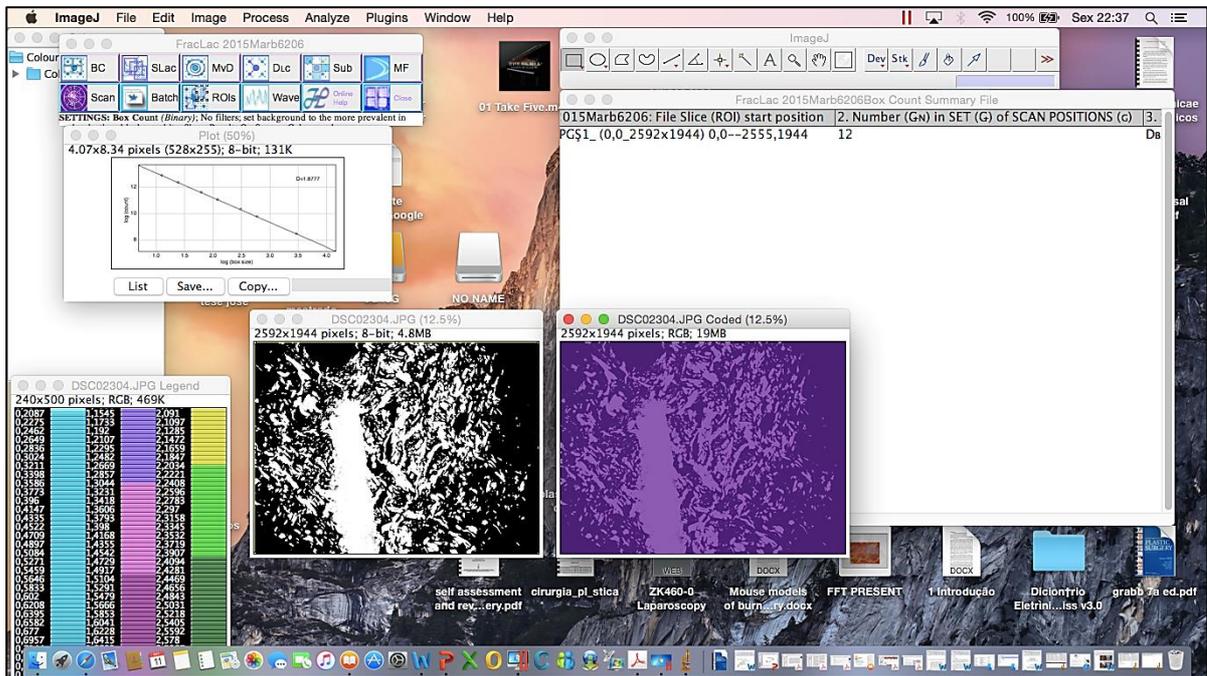
Fonte: Autor

**Figura 20** – Captura da tela durante o processo de binarização da imagem corada pelo picosirius sob polarização.



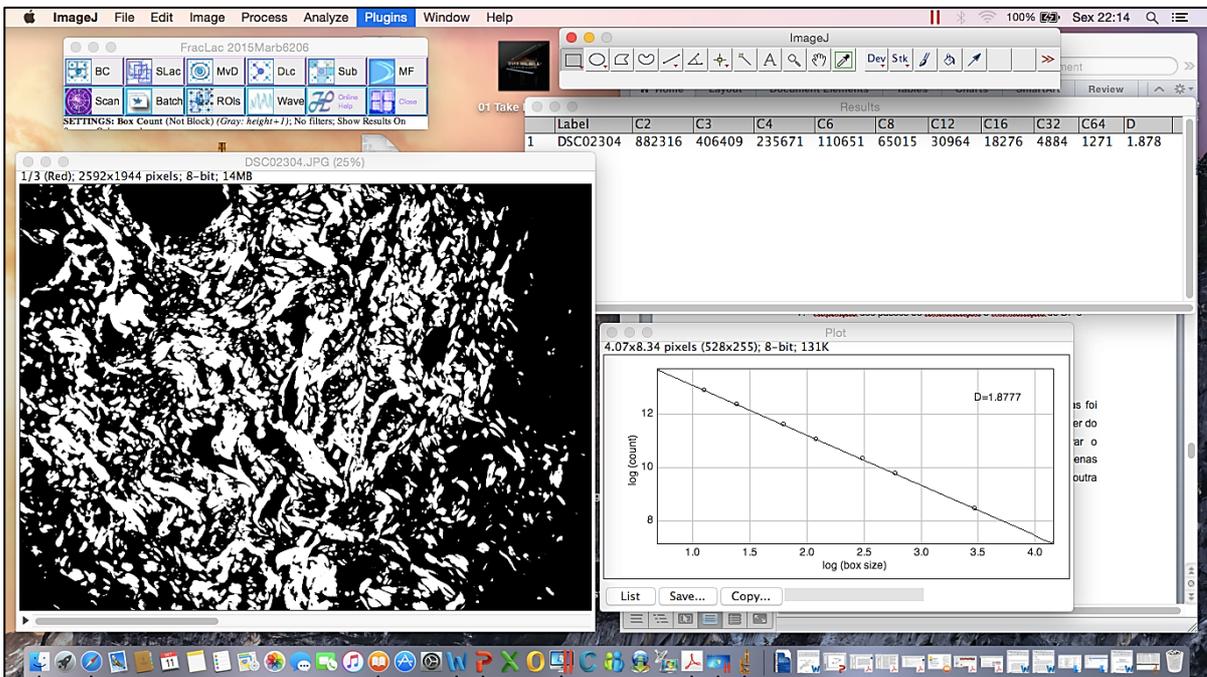
Fonte: Autor.

**Figura 21** – Captura da tela do processo de mensuração da Dimensão Fractal e Lacunaridade do colágeno global utilizando o plugin FracLac do ImageJ



Fonte: Autor.

**Figura 22** – Captura da tela do processo de mensuração da Dimensão Fractal e Lacunaridade do colágeno tipo I e tipo III utilizando o plugin FracLac do ImageJ



Fonte: Autor.

A avaliação quantitativa do alinhamento das fibras colágenas foi feita de forma semi-automática baseando-se na Transformada Rápida de Fourier (FTT) do programa ImageJ. Inicialmente, imagens-teste foram empregadas para calibrar o sistema. Consistiam em três imagens binarizadas (preto e branco), sendo uma contendo apenas linhas horizontais ( $0^\circ$ ), outra com linhas verticais ( $90^\circ$ ) e outra com linhas inclinadas a  $45^\circ$  (fig 23 a 25).

**Figura 23** – Imagem teste a  $0^\circ$



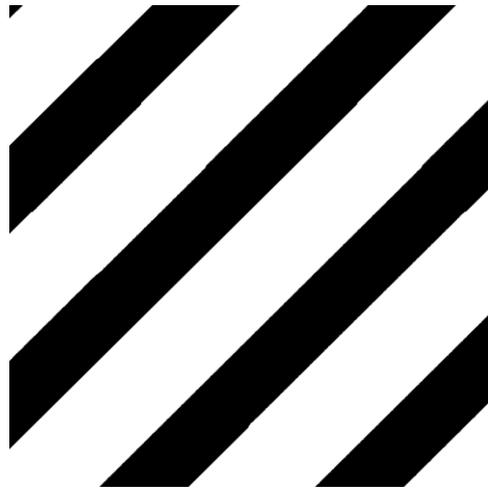
Fonte: Autor.

**Figura 24** – Imagem teste a  $90^\circ$ .



Fonte: Autor.

**Figura 25** – Imagem teste a 45°.



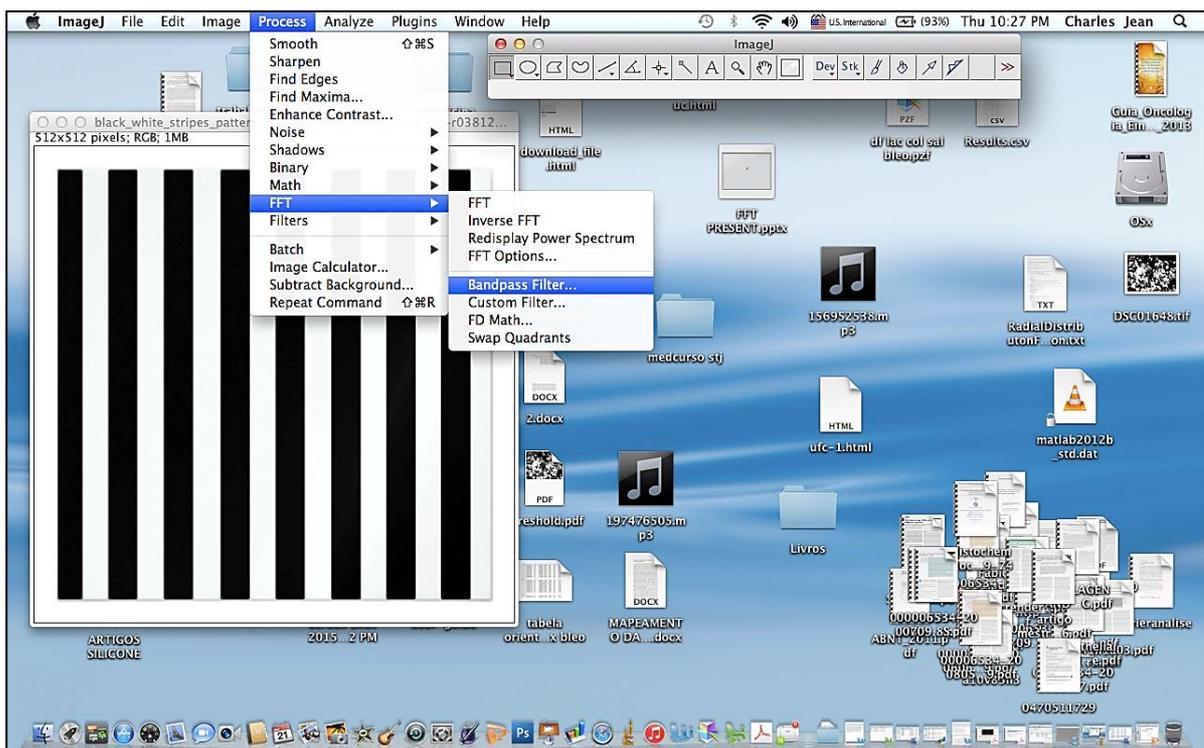
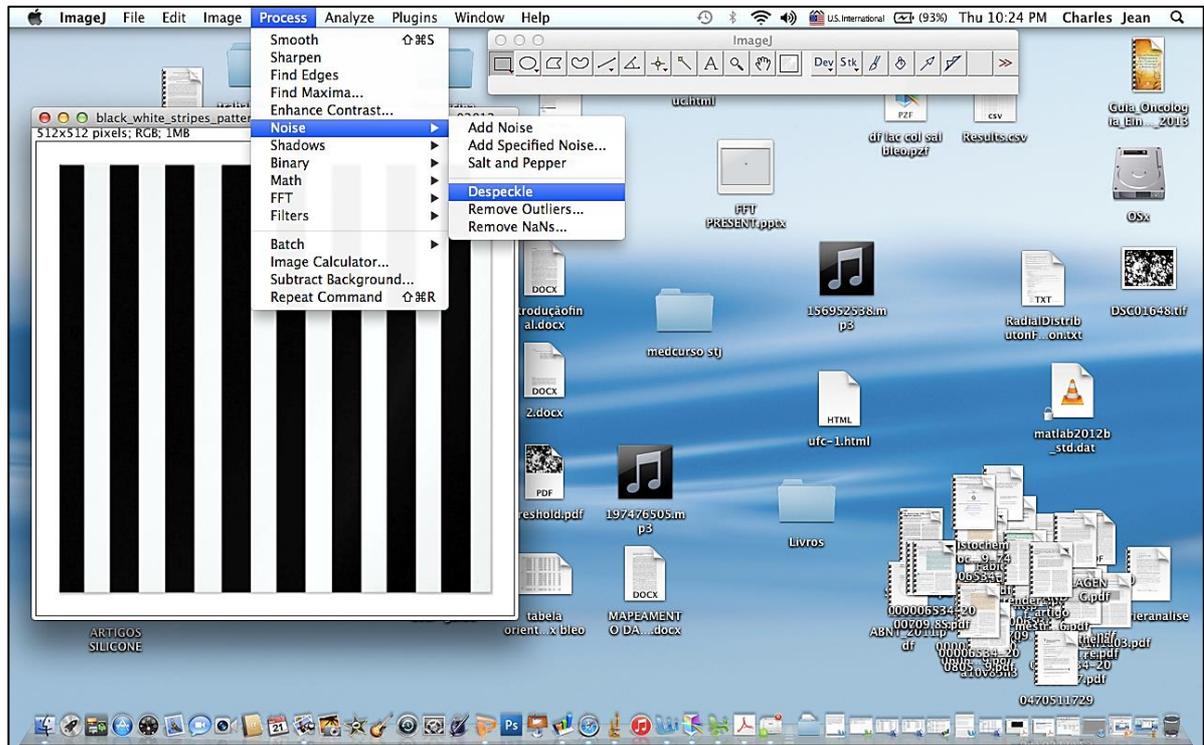
Fonte: Autor.

A seqüência do processo de mensuração da orientação das linhas das imagens teste assim como do colágeno com relação ortogonal à epiderme feita pelo Image J é feita pelo *script* seguinte:

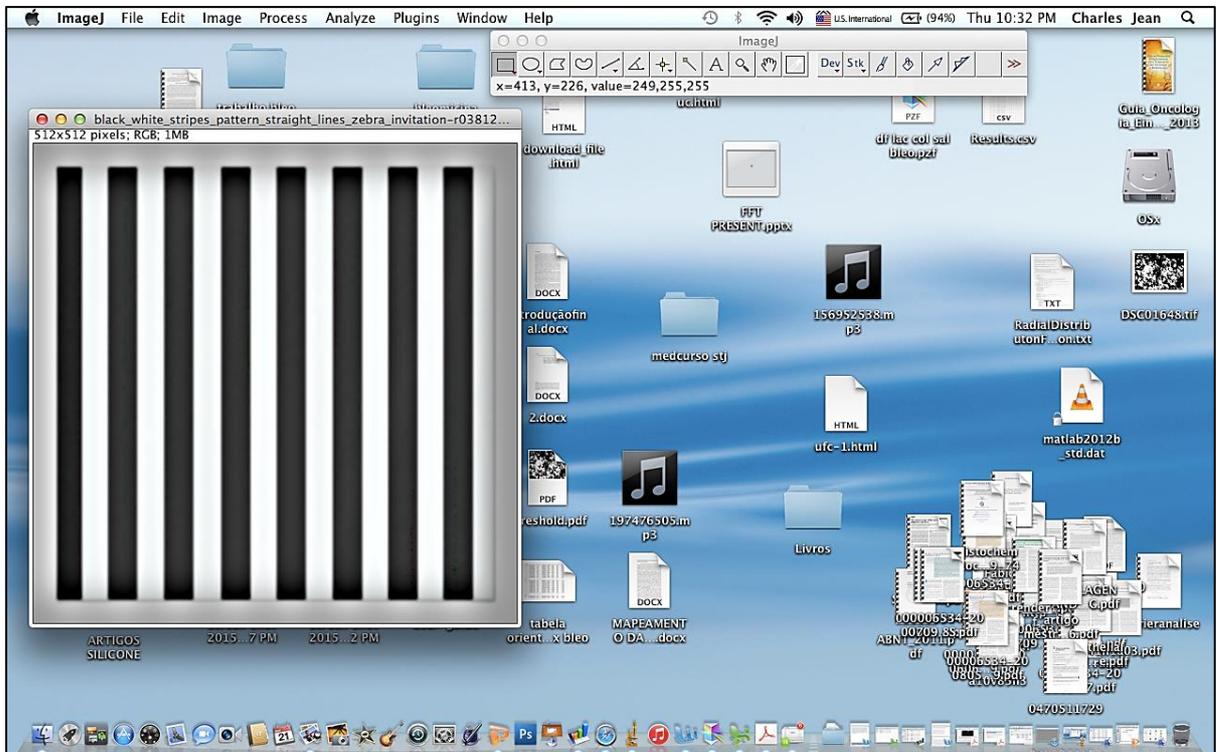
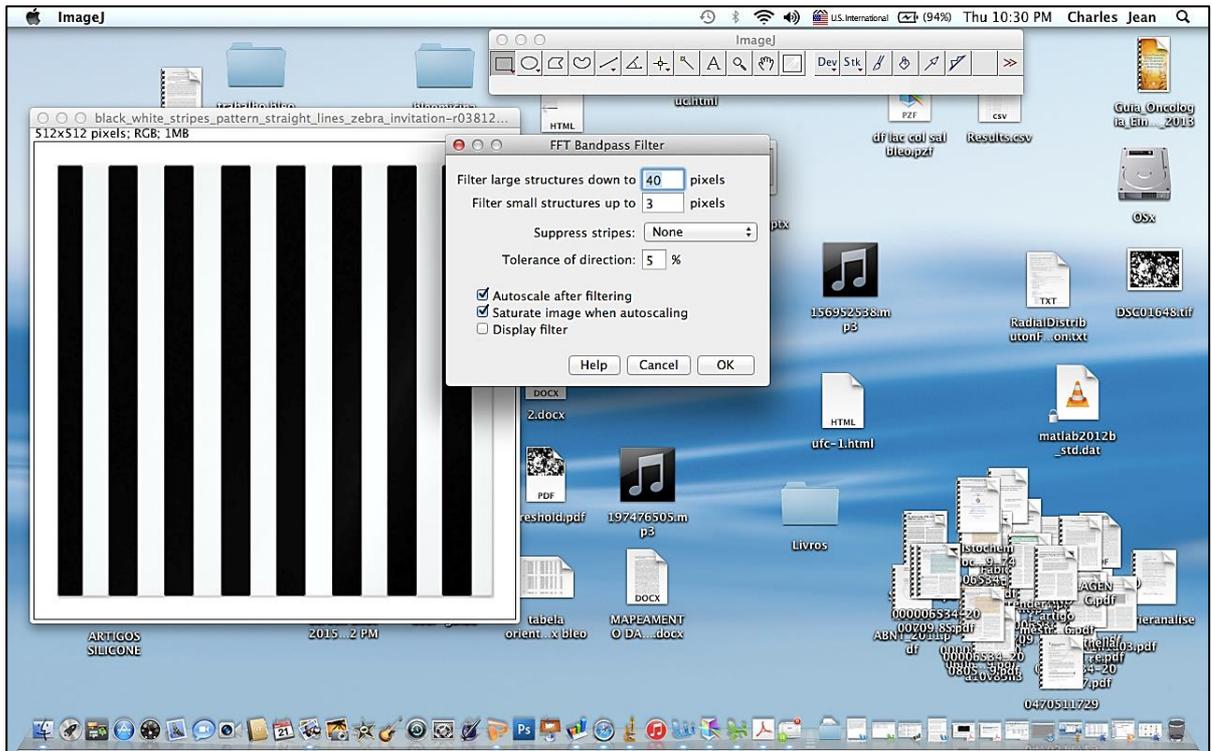
1. Importação das imagens.
2. Utilização da ferramenta *Noise->Despeckle* (desfoque seletivo).
3. Conversão das imagens coloridas em imagens de 8 bits seguida por duplicação das mesmas.
4. Redenrização das imagens: Binarização da imagem.
5. Convolução (limpeza do sinal) utilizando o filtro *bandpass filter* baseado na transformada rápida de Fourier (FFT).
6. Limiarização da imagem com a ferramenta *Autolocal Threshold*.
7. Ajuste fino com o filtro *Sauvola*.
8. Repetição de *Make Binary*, seguido pelo passo *Open* (combinação de *erode + dilate*) que serve para individualizar conjuntos de pixels (ou colágeno) de diferentes qualidades.
9. Emprego da ferramenta *Analyze* (analisar) habilitando a ferramenta *fit ellipse*.
10. Avaliação e interpretação dos resultados da organização das imagens.

As figuras 26 a 31 ilustram o processo de calibração do programa ImageJ para o cálculo da orientação do colágeno com relação ortogonal à epiderme utilizando o *script* acima descrito.

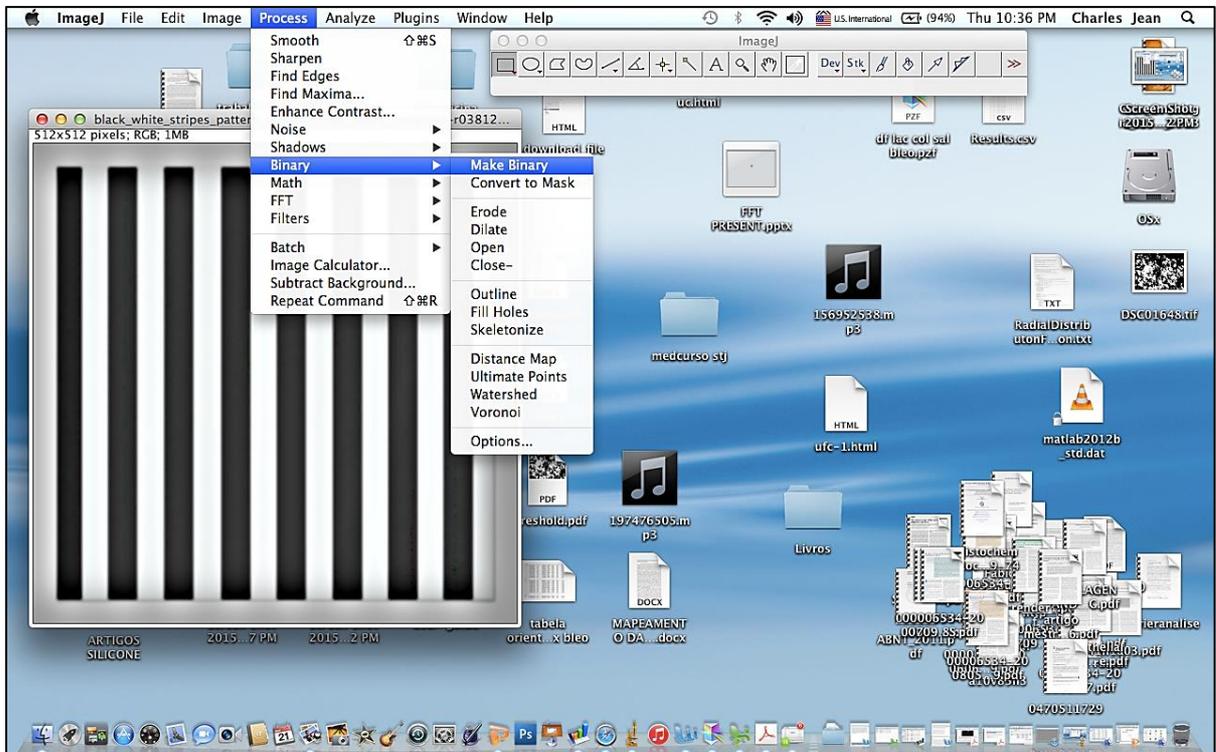
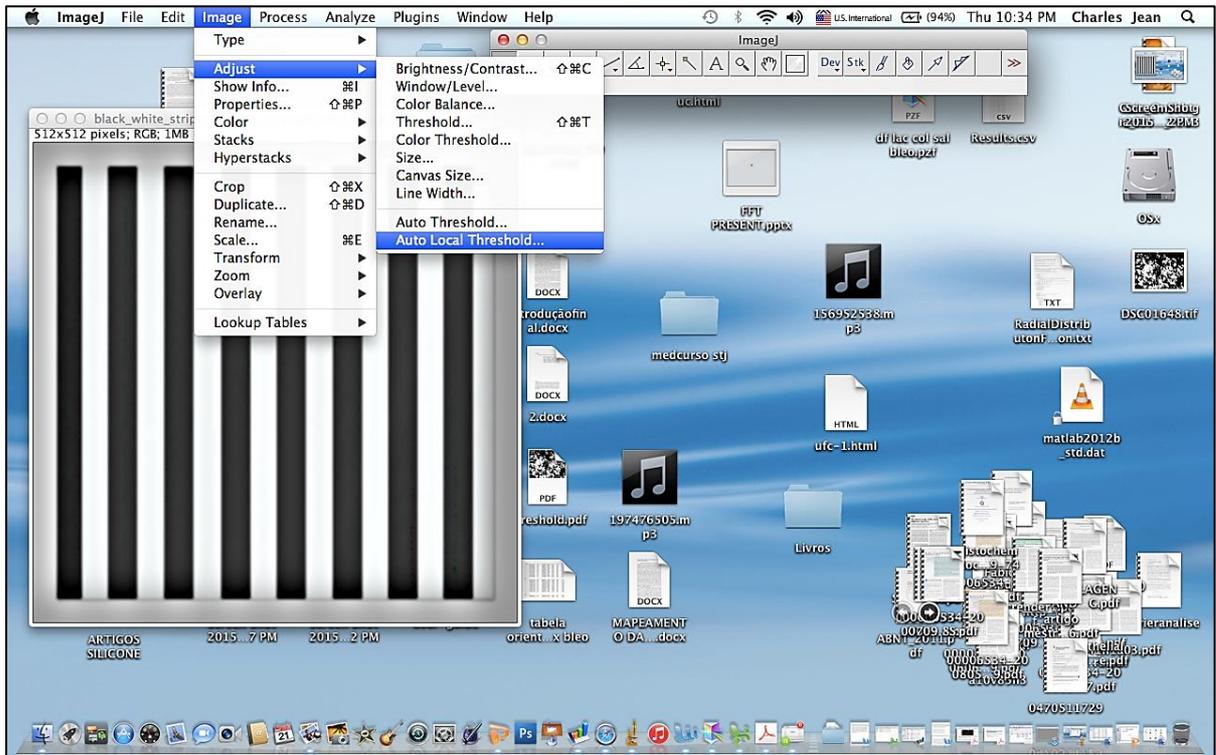
**Figura 26** – Sequência completa do processamento da imagem teste a 90°.



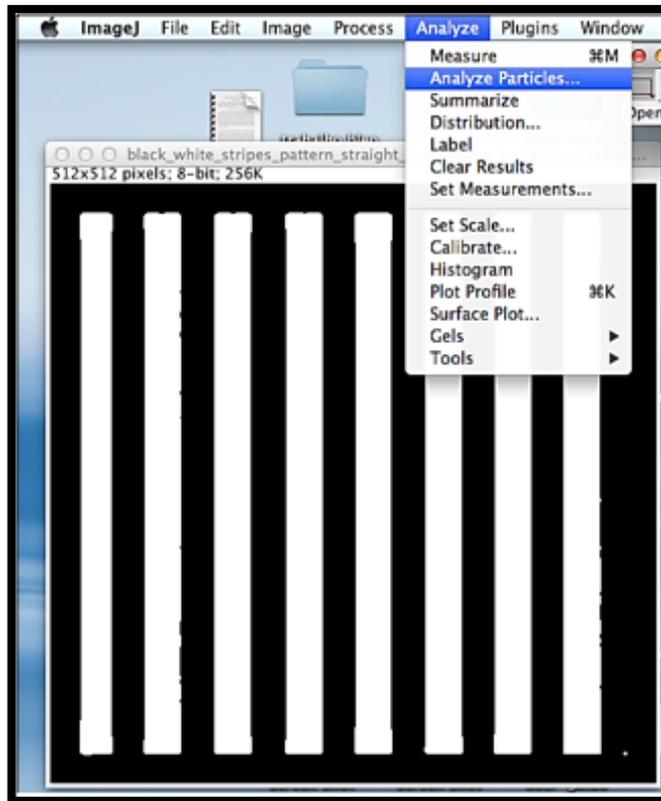
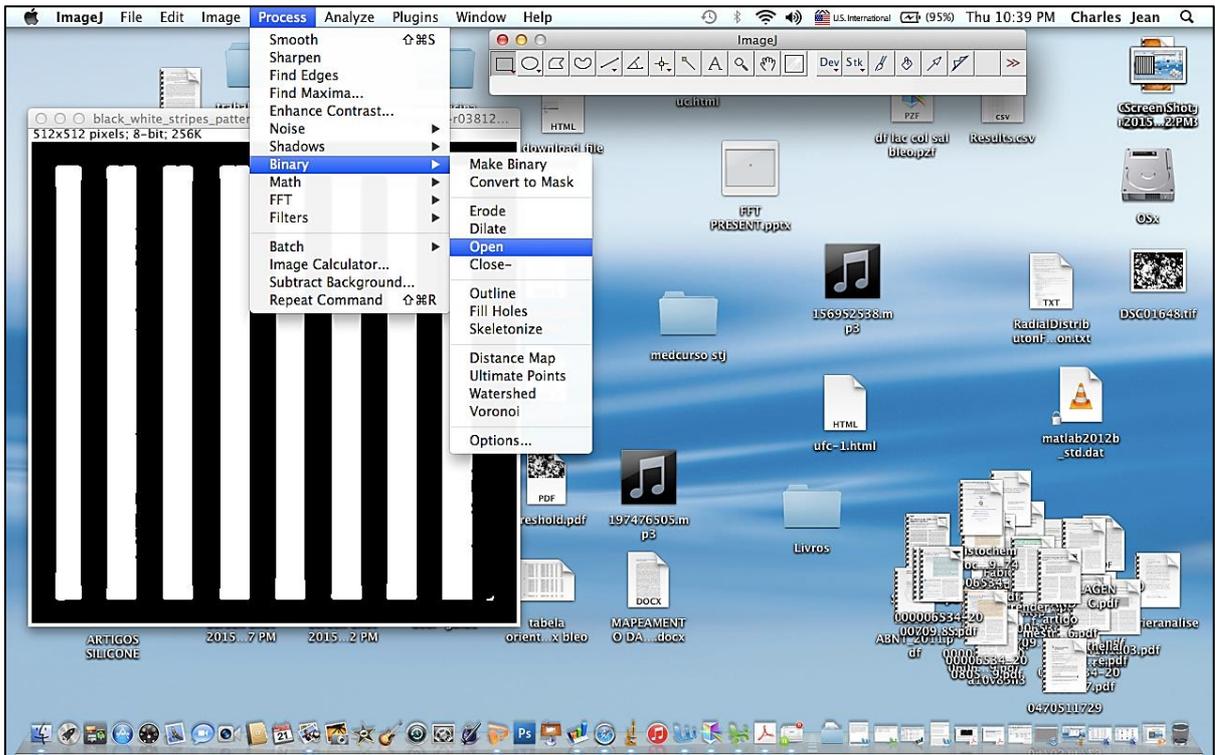
Continuação da Figura 26



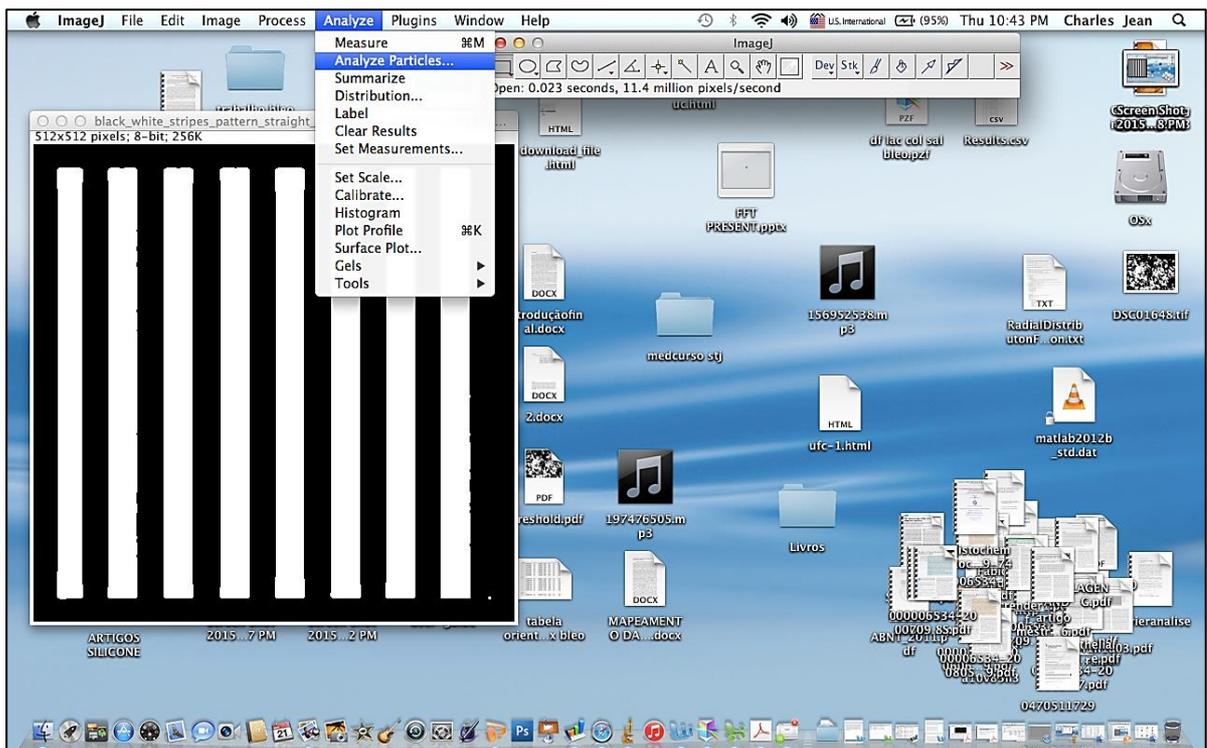
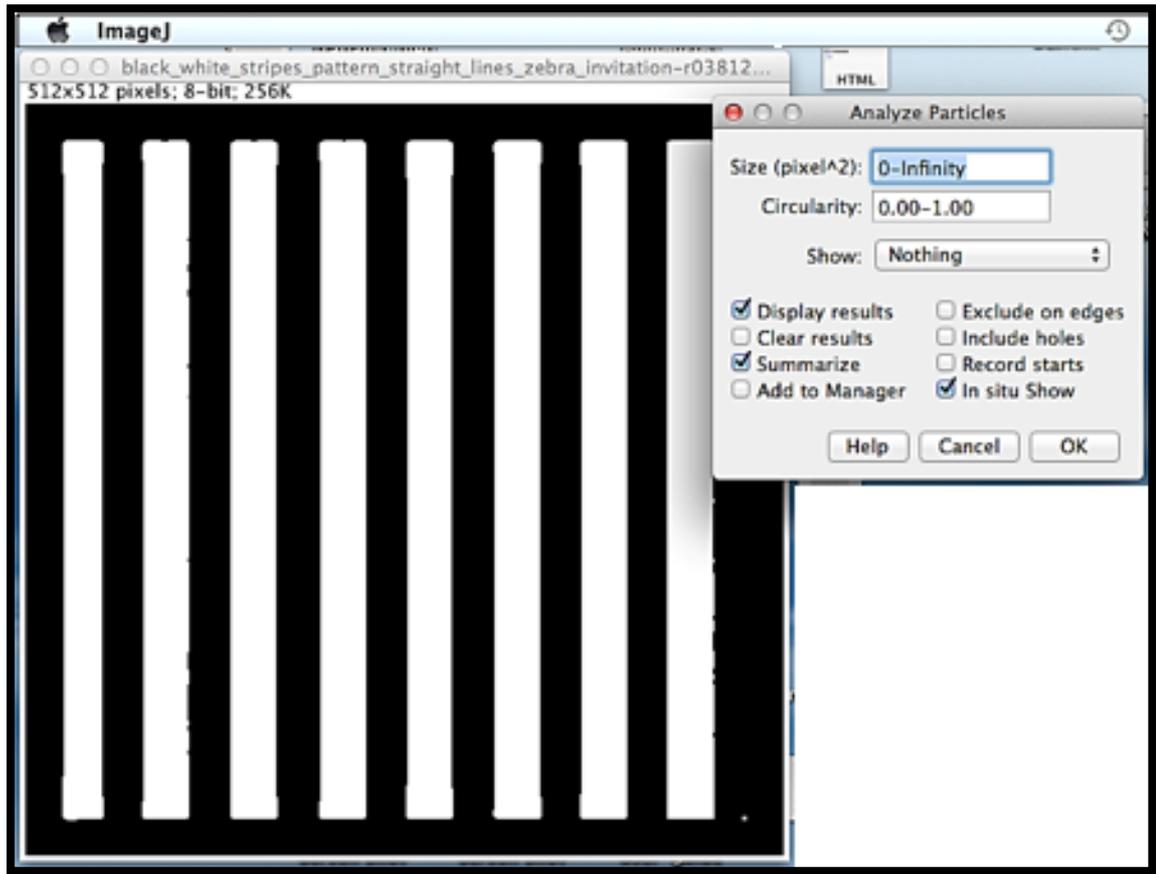
Continuação da Figura 26



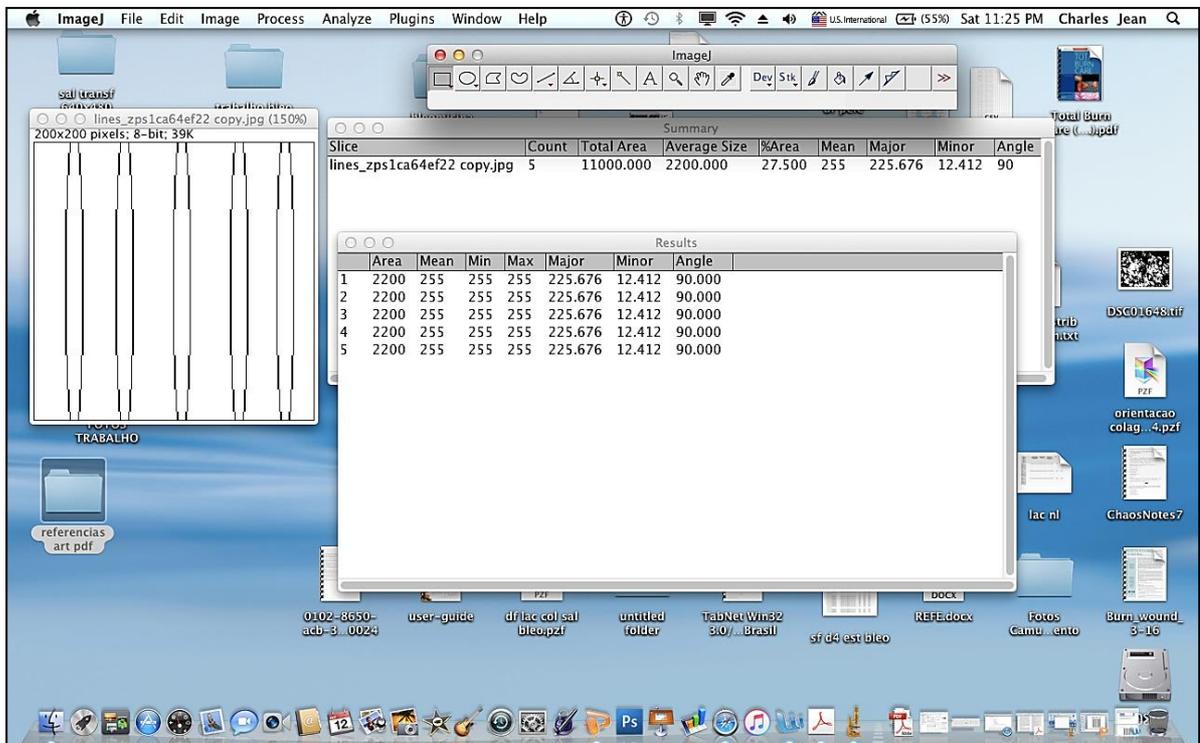
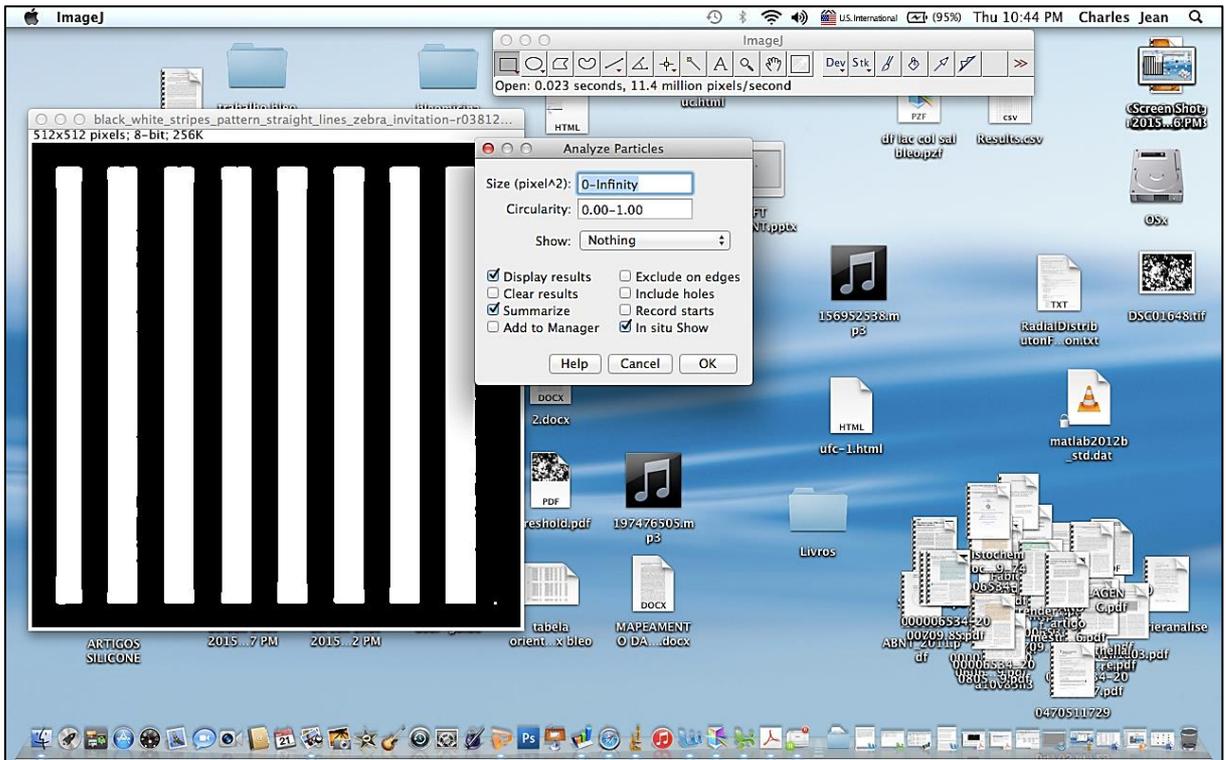
Continuação da Figura 26



Continuação da Figura 26

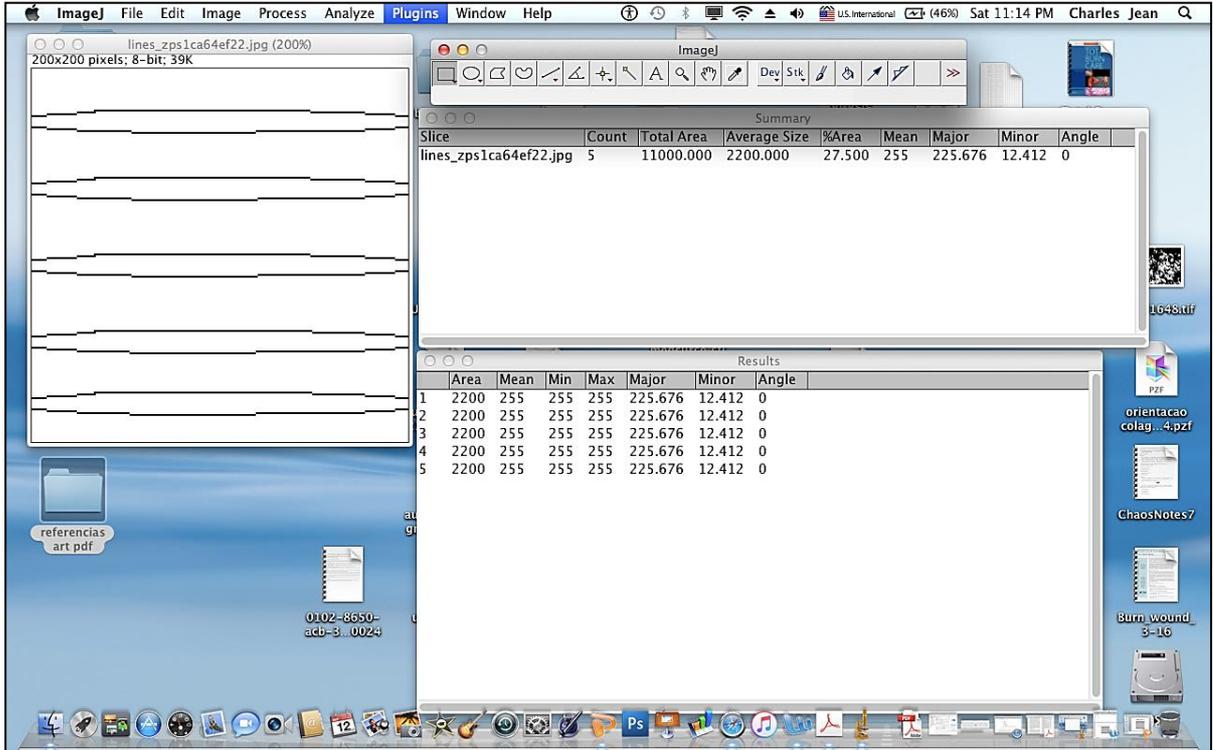


Continuação da Figura 26



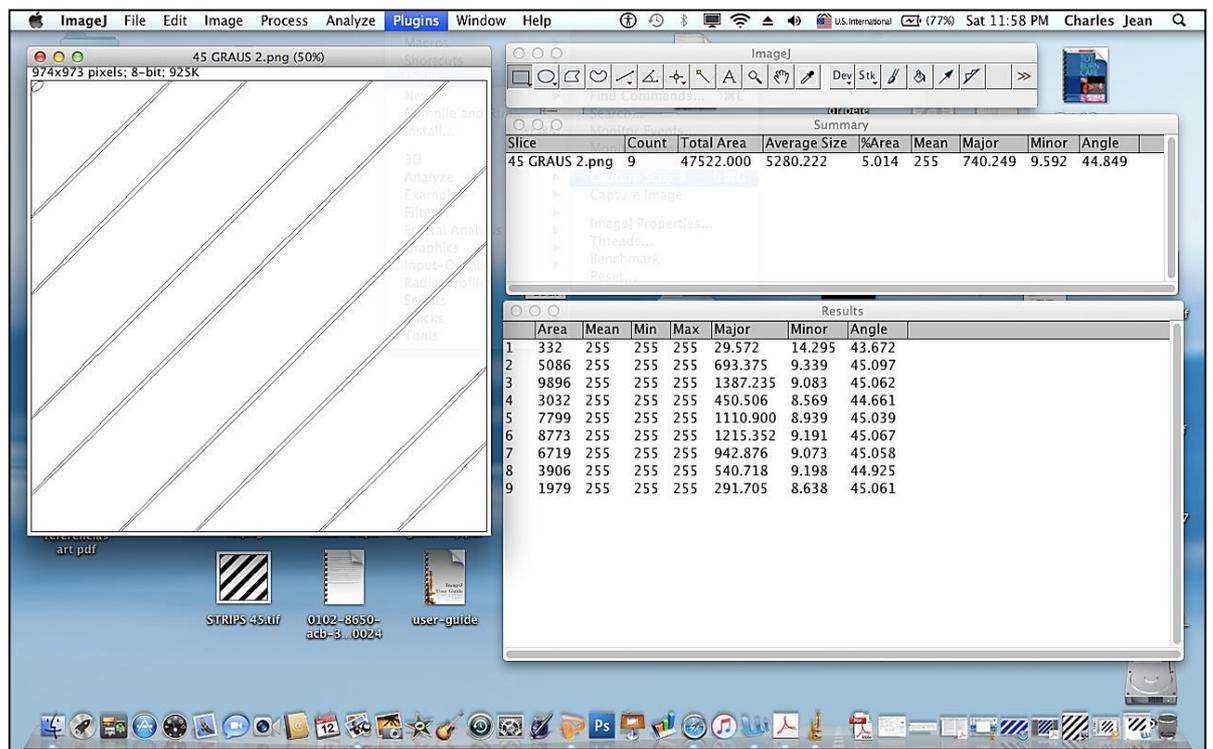
Fonte: Autor.

Figura 27 – Passo final do processamento da imagem teste a 0°

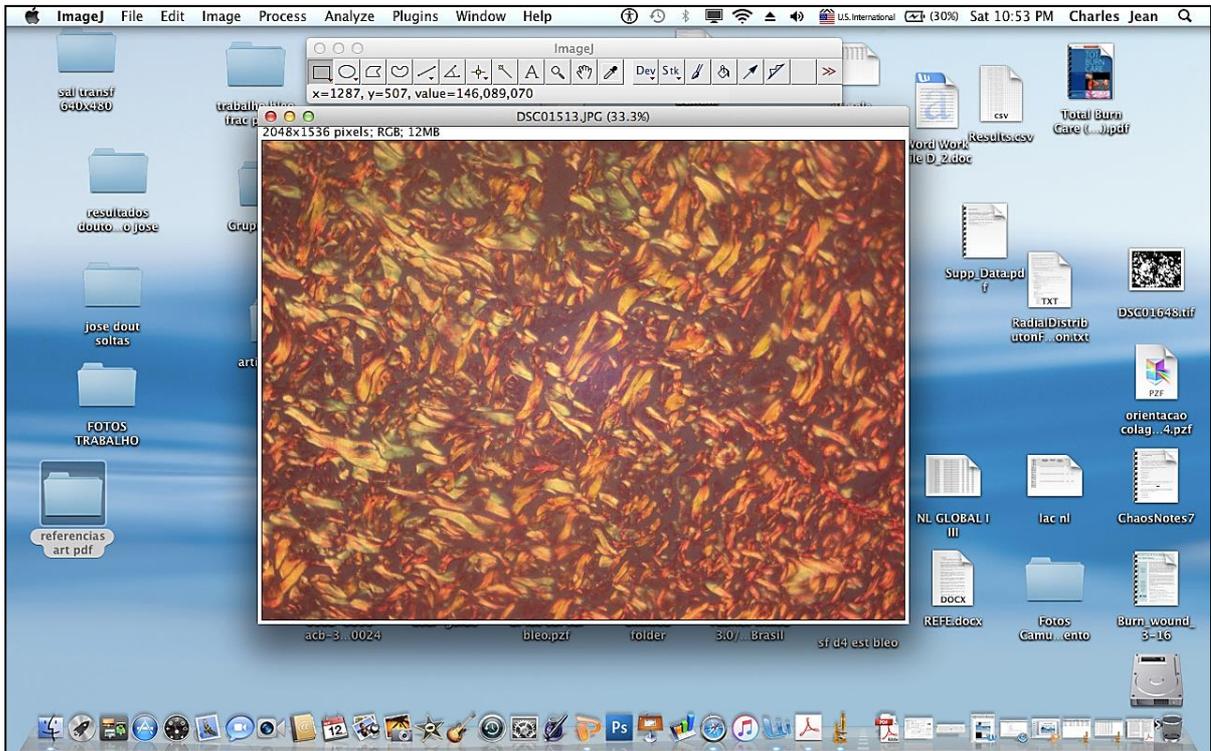


Fonte: Autor

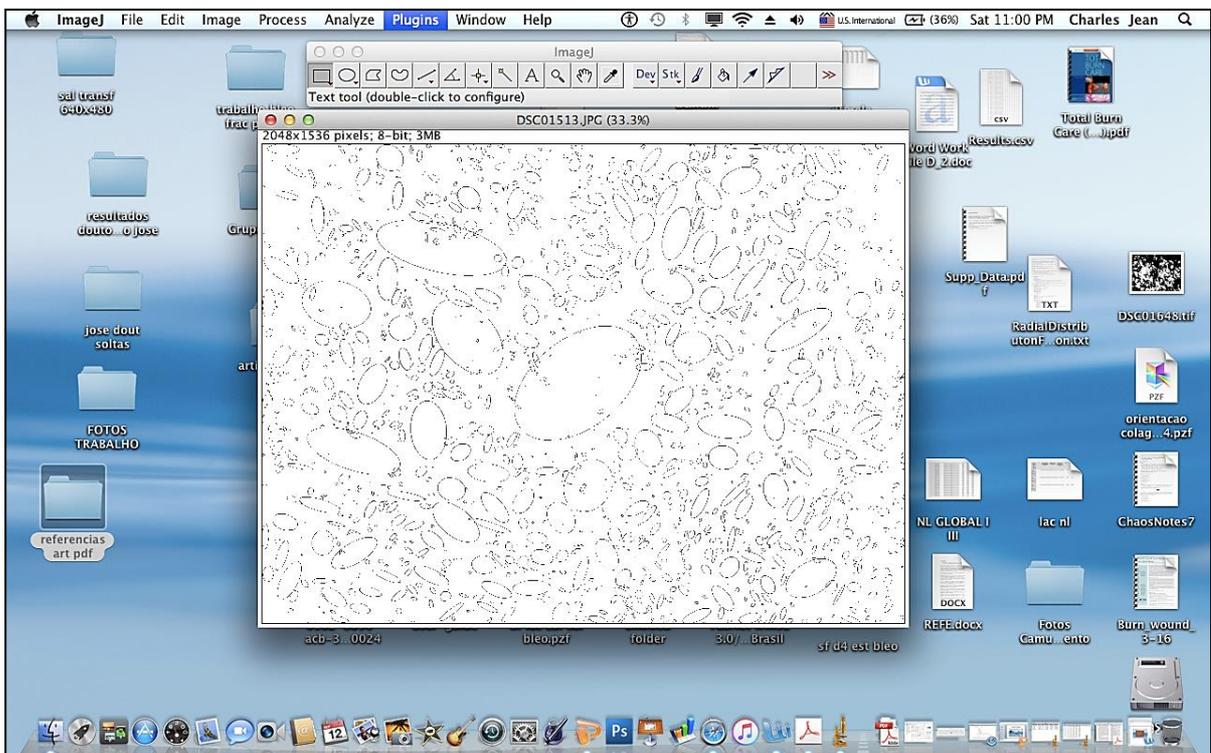
Figura 28 – Passo inicial e final do processamento da imagem teste a 45°



**Figura 29** – Passo inicial da mensuração da organização do colágeno

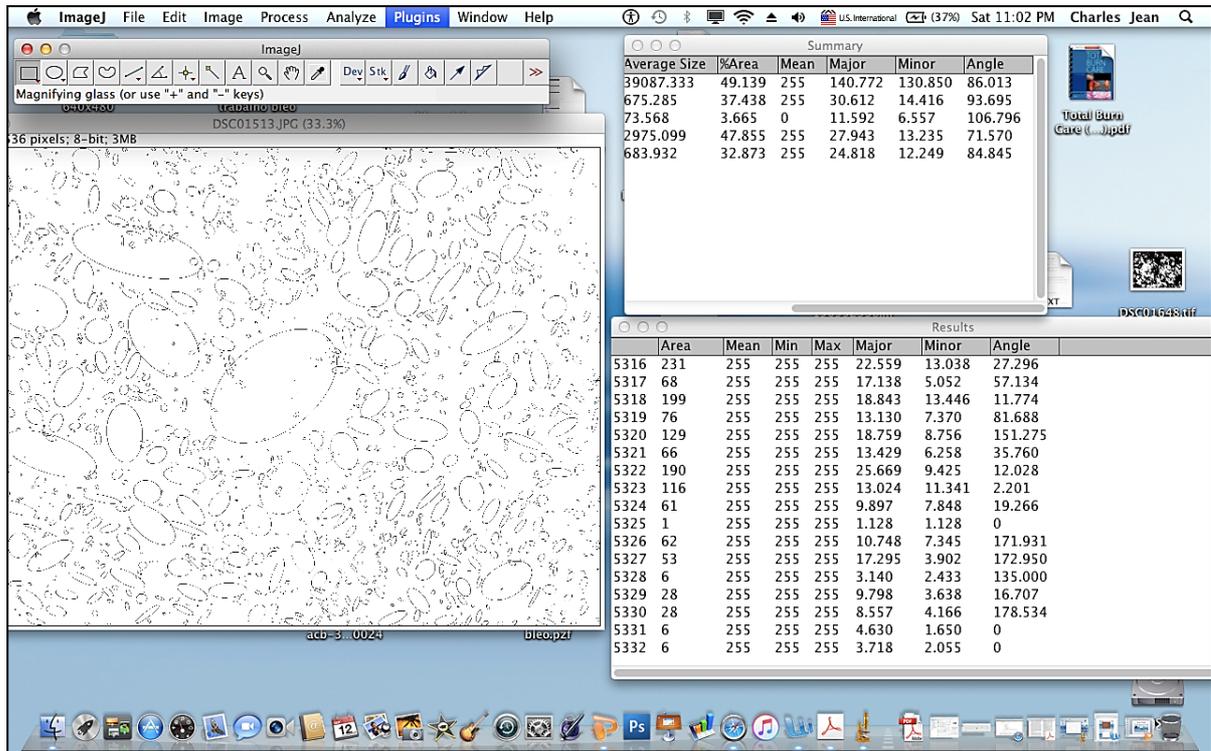


**Figura 30** – Passo intermediário da mensuração da organização do colágeno



Fonte: Autor.

**Figura 31** – Passo final da mensuração da organização do colágeno



Fonte: Autor.

No total, o número de cortes histológicos, imagens obtidas, selecionadas e analisadas correspondeu a:

- 448 cortes (412 de queimaduras + 36 de tecido são (pele não queimada)).
- Selecionadas 96 imagens de queimaduras e 12 imagens de tecido são 324 mensurações da dimensão fractal do colágeno global, tipo I e tipo III (Col G, CoL-1 e CoL-3, respectivamente).
- 324 mensurações da lacunaridade do colágeno (col G, 1 e 3)
- 108 mensurações da organização do colágeno.

Enfim, fez-se 752 mensurações do dimensão fractal e lacunaridade do colágeno global, tipo I e tipo III. O número médio de fibras de colágeno analisadas por campo de observação foi estimado em 400 fibras (número de total de fibras analisadas = 300.000). O uso do computador e as ferramentas do programa ImageJ permitiu minimizar sobremaneira tanto o trabalho manual quanto a subjetividade da quantificação do colágeno destas imagens microscópicas das queimaduras.

## 4.9 Estatísticas

Na análise descritiva foram calculadas medidas de tendência central para variáveis quantitativas. Variáveis contínuas foram apresentadas como valores médios e desvio padrão. O teste t de Student não pareado foi utilizado para comparar as mensurações entre os grupos ponto a ponto e as eventuais diferenças consideradas significativas se  $p = 0,05$ . A análise de Variância unicaudal (one-way ANOVA) com Teste post-hoc de Tukey foi computada intra e intergrupos usando valor de P de 0,05 com intervalo de confiança (IC) de 95%. As relações entre DF e orientação do colágeno foram acessados utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados da análise comparativa foram representados graficamente. Toda a análise estatística e gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS

Aqui são apresentados os resultados das diferentes técnicas de análise das imagens digitais de secções histológicas de queimaduras coradas pelo vermelho de picrossirius (*Sirius Red F3BA*) sob luz polarizada em condições padronizadas. Primeiramente, são mostrados dados referentes à quantificação semiautomatizada da Dimensão Fractal (DF) e da Lacunaridade (LAC) da arquitetura do colágeno global (Col-G) e dos colágeno tipo I (Col-1) e tipo III (Col-3). A seguir são abordados a quantificação da organização, alinhamento e angulação das fibras colágenas em relação ortogonal ao plano da superfície do epitélio, utilizando-se Transformadas Rápidas de Fourier (FFT) e o método de extração automatizada do escore de alinhamento baseado na binarização (BEAS) proposto por Xu e colaboradores (2012).

O fato de terem sido analisados três conjuntos de imagens distintas, a partir de amostras coletadas de diferentes indivíduos, em quatro tempos diversos de eutanásia permite considerar tais amostras como independentes. Os animais que foram submetidos a queimaduras de espessura parcial receberam tratamento intralesional em dose única com solução salina (SF0,9%) ou com bleomicina enquanto o grupo controle negativo (pele intacta) não sofreu queimadura e, portanto, não recebeu nenhuma forma de tratamento. Atribuiu-se as denominações SAL e BLEO para os dois grupos de imagens de queimaduras e a denominação CTRL para o grupo não lesionado. Esta nomenclatura foi usada ao longo de toda esta exposição de resultados da avaliação nos quatro momentos ou fases de reparação cicatricial das queimaduras, nomeadamente os dias (d) 4, d7, d14 e d21 pós-queimaduras.

Todas as quantificações semiautomatizadas da DF e LAC da organização do Col-G, Col-1 e Col-3 foram realizada com o auxílio do *plugin* FracLac do programa gratuito de análise de imagens ImageJ (RASBAND, 1997-2014). O mesmo programa foi utilizado para a FFT e BEAS.

## 5.1 Dimensão Fractal (DF) do colágeno

A análise estatística com o teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou que os dados obtidos responderam positivamente ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, sendo considerados, portanto, dados paramétricos.

A análise das diferenças entre os diversos tempos dentro de um mesmo grupo queimado foi denominada comparação intragrupo e a entre os vários tipos de tratamento (como SAL x BLEO, CTRL x SAL e CTRL x BLEO) denominada comparação intergrupos.

Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e, para analisar as diferenças entre amostras controle não-queimadas e aquelas tratadas com salina ou bleomicina nos quatro tempos pós-queimadura, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um critério para amostras independentes (conhecida como ANOVA 1 fator) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett quando apropriado.

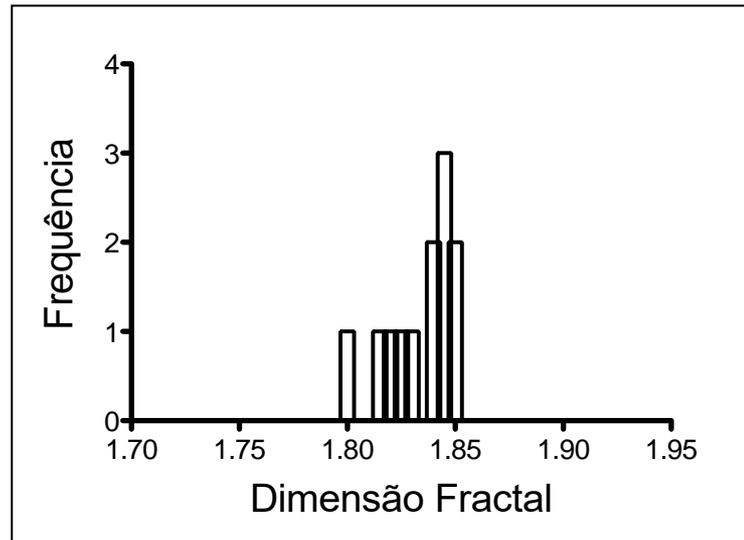
A ANOVA também foi utilizada para comparação intragrupo SAL ou BLEO, seguida pelo pós-teste de Tukey quando indicada.

Para comparação entre os resultados dos dois grupos de imagens SAL e BLEO nos diversos momentos utilizou-se o teste t de Student para amostras não emparelhadas. O nível de significância escolhido em todos os casos foi 0,05.

### 5.1.1 Dimensão Fractal (DF) do colágeno global (Col-G)

O valor da DF do Col-G na pele intacta (CTRL) foi de  $1,833 \pm 0,016$  (mínimo = 1,800 e máximo = 1,85). O valor médio da DF da pele intacta serviu de referencia para comparação com os grupos de queimaduras tratados com salina ou bleomicina. O histograma da distribuição de valores da DF do grupo CTRL e a estatística descritiva deste grupo estão representados abaixo (Fig. 32 e Tabela 1)

**Figura 32** – Histograma de freqüência dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global na pele intacta.



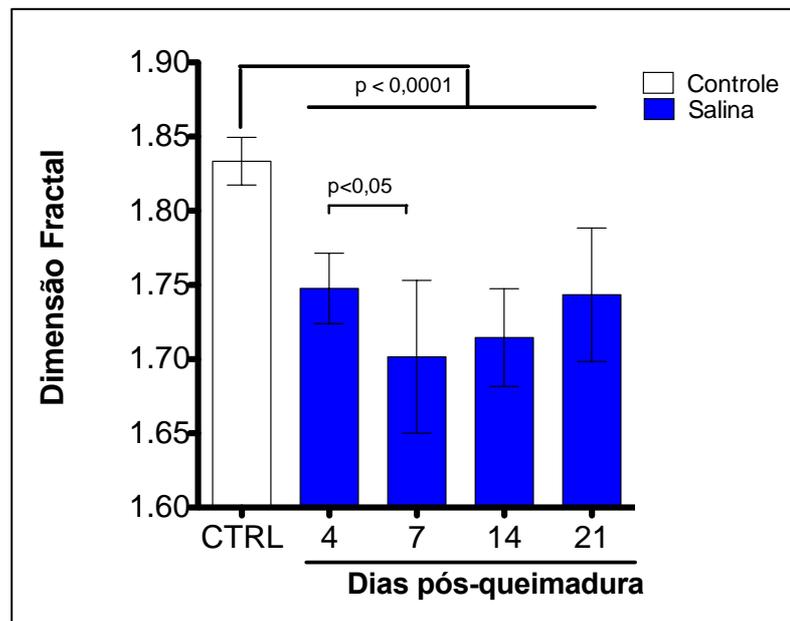
**Tabela 1** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo intacto (CTRL).

<b>Estatísticas</b>	<b>Valores</b>
Número de imagens	12
Mínimo	1,800
Percentil 25	1,821
Mediana	1,840
Percentil 75	1,846
Máximo	1,850
Média	1,833
Desvio-Padrão	0,01609
Erro Padrão da Média	0,004644
Intervalo de Confiança 95% inferior	1,823
Intervalo de Confiança 95% superior	1,844

Na análise da DF do Col-G feita pela ANOVA 1 fator associado ao teste de comparações múltiplas de Dunnett mostrou diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre o valor de DF na pele intacta ( $1,833 \pm 0,016$ ) e os da DF de todos os momentos da progressão do reparo cicatricial no conjunto de imagens de queimaduras do grupo SAL. Ocorreu uma queda da DF no d4 ( $1,748 \pm 0,024$ ) com relação ao CTRL. Esta diminuição se acentuou no d7 ( $1,702 \pm 0,051$ ). No d14 houve uma recuperação discreta na DF ( $1,715 \pm ,033$ ), retornando no d21 ao valor médio de  $1,43 \pm 0,045$ , valor semelhante ao de d4, porém bastante inferior ao da pele

intacta (Fig. 33). A estatística descritiva dos valores da DF do Col-G do grupo salina nos diversos tempos encontra-se na tabela 2.

**Figura 33** – Valores médios e desvios padrões da dimensão fractal do colágeno global (Col-G) no grupo controle intacto (CTRL) e nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos. A análise de variância (ANOVA) 1 fator com teste de Dunnett mostrou que houve diferença extremamente significativa Intergrupos SAL e CTRL em todos os momentos ( $p < 0,0001$ ). Intragrupo SAL ocorreu diferença estatisticamente significativa entre d4 vs. d7 ( $p < 0,05$ , ANOVA 1 fator com Teste de Tukey).



**Tabela 2** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo Salina em diferentes momentos pós-queimadura.

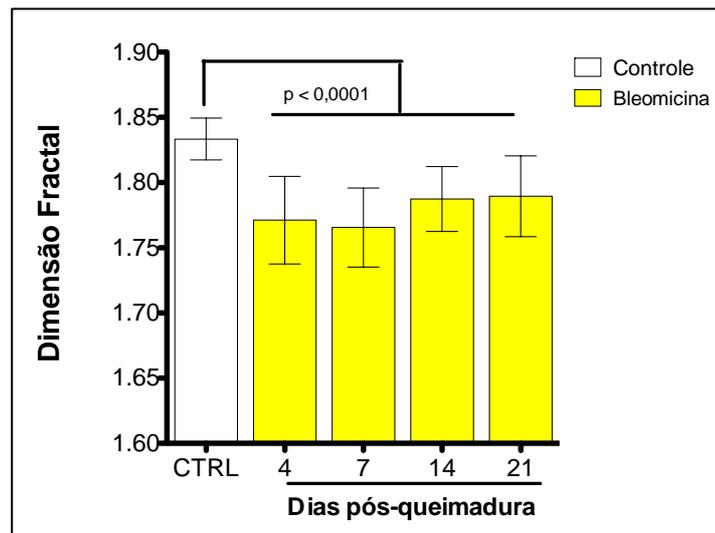
Estatísticas	Dias pós-queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Mínimo	1,712	1,600	1,672	1,687
Máximo	1,805	1,754	1,781	1,839
Média	1,748	1,702	1,715	1,743
Desvio-Padrão	0.02376	0.05146	0.03301	0.04495
Erro Padrão da Média	0.006860	0.01485	0.009528	0.01298

Quanto ao grupo BLEO, também ocorreu uma queda da DF no d4 ( $1,771 \pm 0,035$ ) relativamente ao CTRL. Esta diminuição se acentuou discretamente no d7 ( $1,766 \pm 0,030$ ). Já no d14 houve uma recuperação na DF ( $1,787 \pm 0,025$ ) que aumentou levemente no d21 com  $DF=1,790 \pm 0,030$ , valor também inferior ao da pele intacta (Fig. 31). Dentro do grupo BLEO, apesar das diferenças entre os

valores médios da DF (TAB. 10), a ANOVA 1 fator não evidenciou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,01917$ ) entre os diversos tempos (Fig. 34).

Na comparação intergrupo CTRL e BLEO, a ANOVA 1 fator com o teste de comparações múltiplas de Dunnett mostrou diferenças extremamente significativas ( $p<0,0001$ ) entre o valor da DF do controle não-queimado com os valores da DF do Col-G do grupo BLEO em todos os momentos. A estatística descritiva dos valores da DF do Col-G do grupo BLEO nos diversos tempos encontra-se na tabela 3.

**Figura 34** – Valores da dimensão fractal do colágeno global (Col-G) nas queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo e no grupo controle (CTRL) não queimado. Intragrupo BLEO não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os diversos momentos pós-queimadura ( $p=0,01917$ , ANOVA 1 fator). Na comparação intergrupos BLEO e CTRL houve diferença significativa em todos os momentos ( $p < 0,0001$ ) (ANOVA 1 fator com teste de Dunnett).

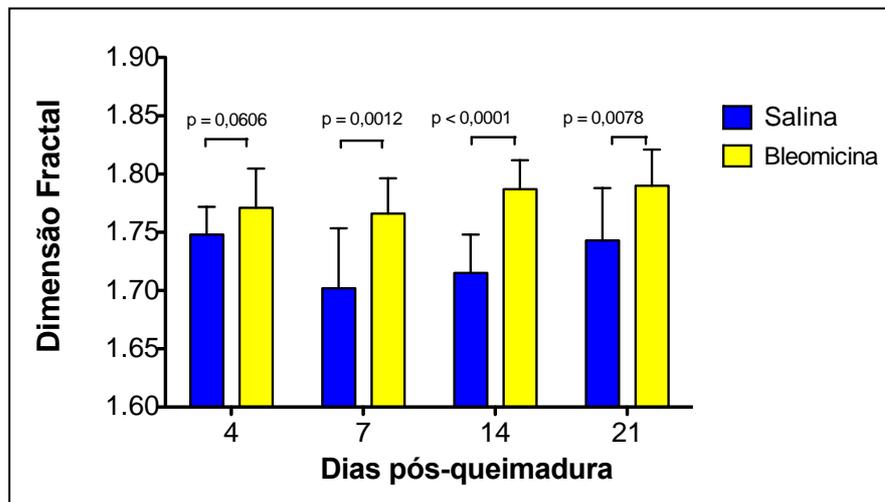


**Tabela 3** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) global do colágeno global nos diferentes tempos no grupo Salina (controle positivo).

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Mínimo	1.687	1.692	1.735	1.740
Máximo	1.807	1.814	1.810	1.837
Média	1.771	1.766	1.787	1.790
Desvio Padrão	0.03358	0.03030	0.02487	0.03099
Erro padrão da média	0.009694	0.008748	0.007179	0.008947

Na comparação da DF do Col-G entre os grupos SAL e BLEO, o teste t de Student para amostras não emparelhadas mostrou diferenças estatisticamente significativas em d7 ( $p=0,0012$ ), em d14 ( $p<0,0001$ ) e novamente em d21 ( $p=0,0078$ ). Não houve diferença estatística significativa entre os valores médios da DF do grupo SAL e BLEO no d4 ( $p=0,0606$  (Fig. 35; Tab. 4).

**Figura 35** – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno global (Col-G) entre as queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste t de Student para amostras não correlacionadas ocorreram diferenças estatisticamente significativas intergrupos em d7 ( $p=0,0012$ ), d14 ( $p<0,0001$ ) e d21 ( $p=0,0078$ ) pós-queimadura.



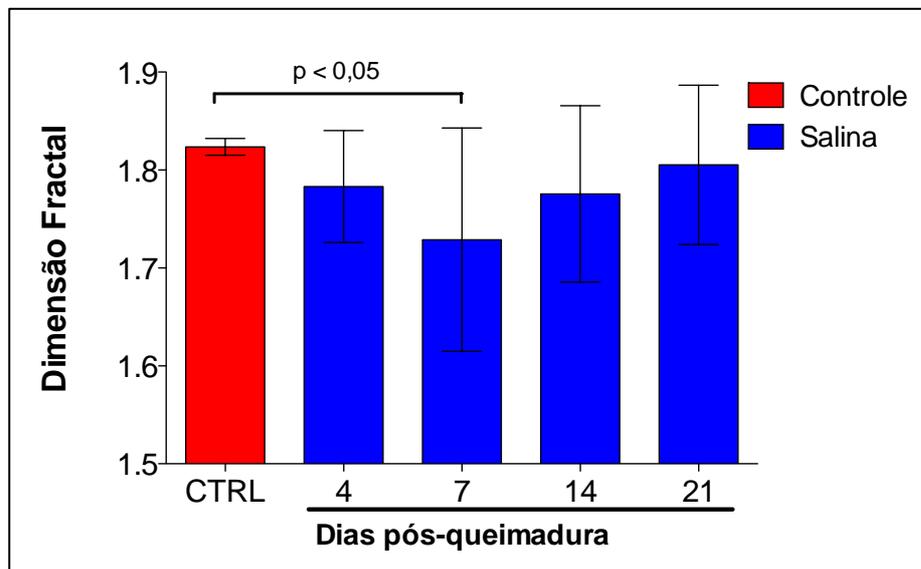
**Tabela 4** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno global nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	Grupos							
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	1,712	1,687	1,600	1,692	1,672	1,735	1,687	1,740
Percentil 25%	1,733	1,760	1,675	1,753	1,689	1,772	1,707	1,765
Mediana	1,747	1,775	1,717	1,768	1,709	1,798	1,737	1,787
Percentil 75%	1,760	1,795	1,745	1,786	1,728	1,806	1,762	1,812
Máximo	1,805	1,807	1,754	1,814	1,781	1,810	1,839	1,837
Média	1,748	1,771	1,702	1,766	1,715	1,787	1,743	1,790
Desvio Padrão	0,02376	0,03358	0,05146	0,03030	0,03301	0,02487	0,04495	0,03099
Erro Padrão da Média	0,006860	0,009694	0,01485	0,008748	0,009528	0,007179	0,01298	0,008947
IC 95% inferior	1,733	1,750	1,669	1,746	1,694	1,772	1,715	1,770
IC 95% superior	1,763	1,793	1,734	1,785	1,736	1,803	1,772	1,809

### 5.1.2 DF dos colágenos tipo I (Col-1) e tipo III (Col-3)

Os valores relativos à DF do Col-1 no grupo SAL mimetizam aqueles do Col-G. Comparada ao CTRL (DF=1,833 ± 0,016), no d4 pós-queimadura a DF caiu para 1,783 ± 0,0571, diminuição que se acentuou no d7 (1,776 ± 0,114), seguido por uma elevação progressiva em d14 (1,776 ± 0,09) retornando no d21 a um valor de 1,805 ± 0,081, aproximando-se do valor da DF de CTRL. Entretanto, a ANOVA 1 fator com o teste de comparações múltiplas de Dunnett mostrou diferença média significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre o CTRL e d7 pós-queimadura. Na comparação intragrupo SAL, a ANOVA não evidenciou diferença significativa ( $p = 0,2444$ ) (Fig 36 e Tab 5).

**Figura 36** – Dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-1) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos do estudo e no grupo intacto (CTRL). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre CTRL e d7 (ANOVA 1 fator com teste de comparações múltiplas de Dunnett). Na análise intragrupo SAL não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os diversos momentos ( $p = 0,2444$ , ANOVA 1 fator para amostras independentes).



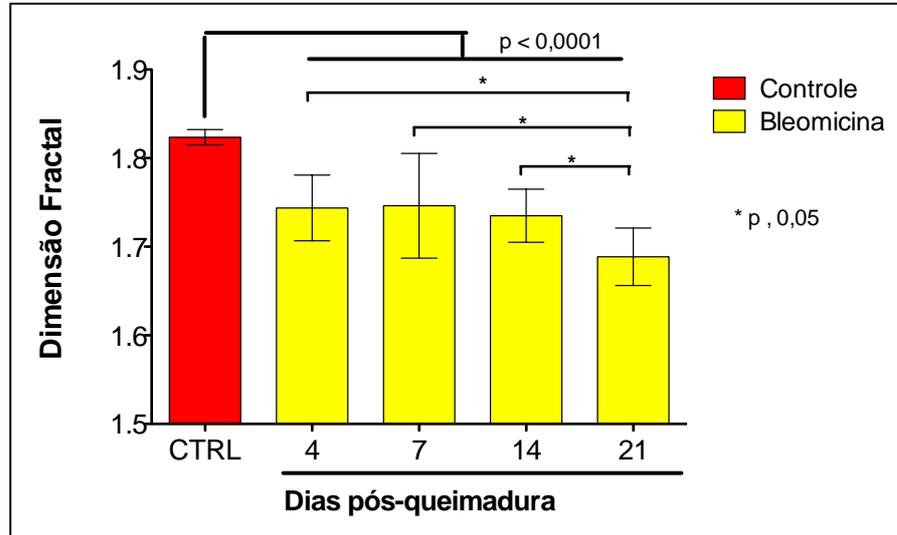
**Tabela 5** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (*DF*) da organização do colágeno tipo I (Col-1) nos diferentes tempos no grupo Salina (SAL).

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	1,718	1,596	1,643	1,700
Maximo	1,873	1,892	1,911	1,901
Média	1,783	1,729	1,776	1,805
Desvio Padrão	0,05710	0,1140	0,09007	0,08121
Erro padrão da média	0,01648	0,03291	0,02600	0,02344

Por outro lado, diferentemente do ocorrido no grupo SAL, no grupo BLEO, comparados ao CTRL, o valor da DF da organização do Col-1 diminuiu em d4, mantendo-se no mesmo nível em d7 e d14, voltando novamente a reduzir-se apenas no d21. A diferença entre CTRL e BLEO nos diversos momentos, medida pela ANOVA com comparações múltiplas de Dunnett, mostrou-se extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) em todos os momentos (Fig. 35 e TAB.13).

A análise intragrupo dos valores de DF pela ANOVA 1 fator para amostras independentes evidenciou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0040$ ) entre os vários momentos. O teste de Tukey evidenciou que essas diferenças eram significativas ( $p < 0,05$ ) entre d4 e d21 ( $1,744 \pm 0,03$  vs.  $1,689 \pm 0,03$ ) entre d7 e d21 ( $1,746 \pm 0,06$  vs.  $1,689 \pm 0,03$ ) e novamente entre d14 e d21 ( $1,735 \pm 0,03$  vs.  $1,689 \pm 0,03$ ) (Fig. 37 e Tab. 6).

**Figura 37** – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-1) entre o grupo intacto (CTRL) e as queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. A ANOVA associada ao teste de Dunnett mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os valores da DF do CTRL e todos os momentos do grupo BLEO. Na comparação intragrupo BLEO ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre todos os momentos e d21 (\*  $p < 0,05$ , ANOVA com teste de Tukey).

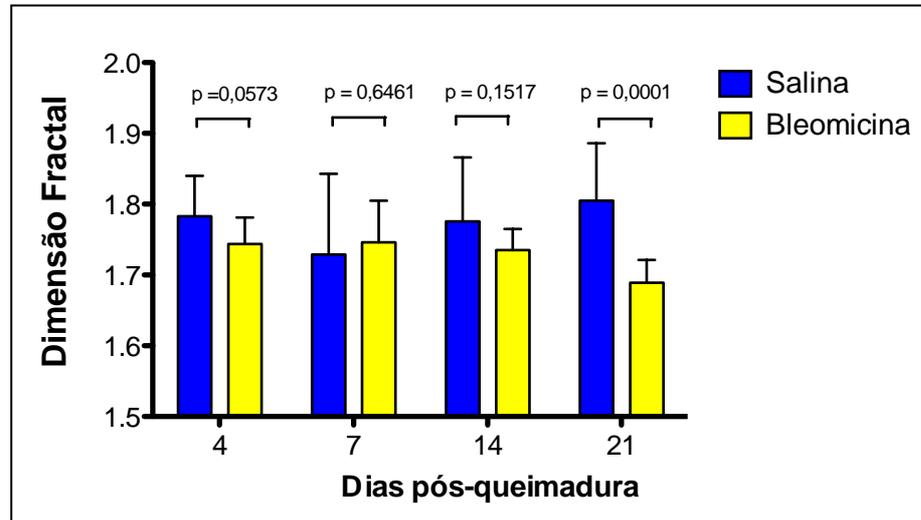


**Tabela 6** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I (Col-1) nos diferentes tempos no grupo Bleomicina (BLEO).

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	1,688	1,644	1,686	1,630
Maximo	1,802	1,894	1,780	1,743
Média	1,744	1,746	1,735	1,689
Desvio Padrão	0,03708	0,05908	0,03001	0,03239
Erro padrão da média	0,01070	0,01705	0,008664	0,009351

Apesar do grupo SAL exibir em todos os momentos valores mais elevados da DF da organização do Col-1 do que o grupo BLEO, a comparação intergrupos salina e bleomicina por intermédio do teste t de Student mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) apenas no d21 (Fig. 38). A estatística descritiva do Col-1 nestes dois grupos encontra-se na tabela 7.

**Figura 38** – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo I (Col-G) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste T de Student para amostras não emparelhadas, ocorreu diferença estatisticamente significativa intergrupos no D21 pós-queimadura ( $p=0,0001$ ).



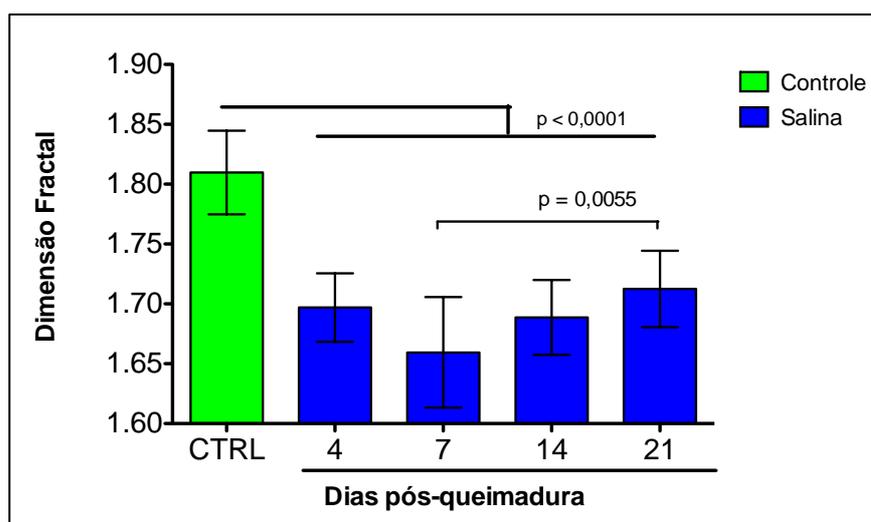
**Tabela 7** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	Grupos		SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	1,718	1,688	1,596	1,644	1,643	1,686	1,700	1,630
Percentil 25%	1,730	1,705	1,605	1,718	1,707	1,707	1,713	1,660
Mediana	1,769	1,747	1,714	1,744	1,746	1,743	1,830	1,692
Percentil 75%	1,839	1,773	1,855	1,762	1,880	1,758	1,879	1,713
Máximo	1,873	1,802	1,892	1,894	1,911	1,780	1,901	1,743
Média	1,783	1,744	1,729	1,746	1,776	1,735	1,805	1,689
Desvio Padrão	0,0571	0,03708	0,1140	0,05908	0,09007	0,03001	0,08121	0,03239
Erro Padrão da Média	0,01648	0,01070	0,03291	0,01705	0,026	0,008664	0,02344	0,009351
IC 95% inferior	1,747	1,720	1,656	1,709	1,718	1,716	1,754	1,668
IC 95% superior	1,819	1,767	1,801	1,784	1,833	1,754	1,857	1,709

No que concerne aos dados relativos à DF do Col-3 no grupo SAL, o comportamento destes foram similares ao do Col-G e Col-1. Houve uma diminuição inicial com relação ao CTRL, seguido por uma acentuação desta queda dos valores médios da DF em d7, ocorrendo depois uma tendência à elevação progressiva em d14 e d21. A ANOVA com o teste de Dunnett mostrou diferença extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre CTRL e todos os momentos pós-queimadura.

Na comparação intragrupo, a ANOVA com o pós-teste de Tukey evidenciou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0055$  entre d7 (DF =  $1,659 \pm 0,04612$ ) e d21 (DF =  $1,712 \pm 0,03192$ ) (Fig. 39 e Tab. 8).

**Figura 39** – Dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) nos diferentes tempos do estudo. Ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0055$ , 1-way ANOVA, Tukey post-hoc) entre d7 e d21 pós-queimadura.

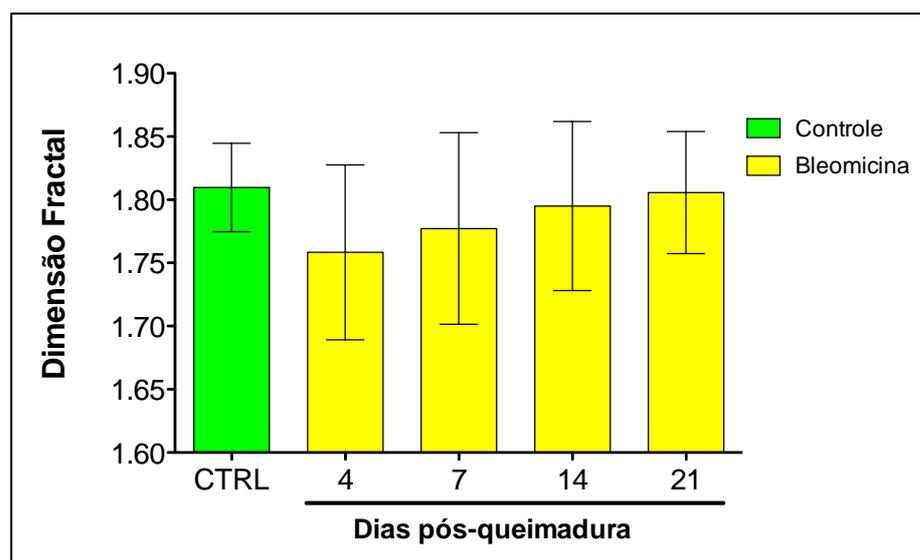


**Tabela 8** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo III (Col-3) nos diferentes momentos no grupo Salina (SAL).

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	1.616	1.574	1.645	1.668
Maximo	1.729	1.716	1.739	1.774
Média	1.697	1.659	1.689	1.712
Desvio Padrão	0.02852	0.04612	0.03127	0.03192
Erro padrão da média	0.008234	0.01332	0.009026	0.009215

No grupo BLEO também ocorreu uma diminuição do valor médio da DF do Col-3 em d4 comparando ao CTRL. A seguir houve aumento progressivo da DF, chegando no d21 ao valor médio da DF de  $1,806 \pm 0,03494$ , ligeiramente inferior ao CTRL ( $1,810 \pm 0,04836$ ). Na comparação entre CTRL e BLEO não houve diferença estatística significativa ( $p = 0,2233$ ) (Ver Fig. 40). O mesmo ocorreu na comparação intragrupo BLEO ( $p = 0,3230$ ). Os dados da estatística descritiva estão na Tab 9.

**Figura 40** – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) entre o grupo intacto (CTRL) e as queimaduras do grupo Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. A ANOVA 1 fator não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2233$ ) entre os valores da DF do CTRL em nenhum momento. Na comparação intragrupo BLEO a ANOVA também não evidenciou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,3230$ ).

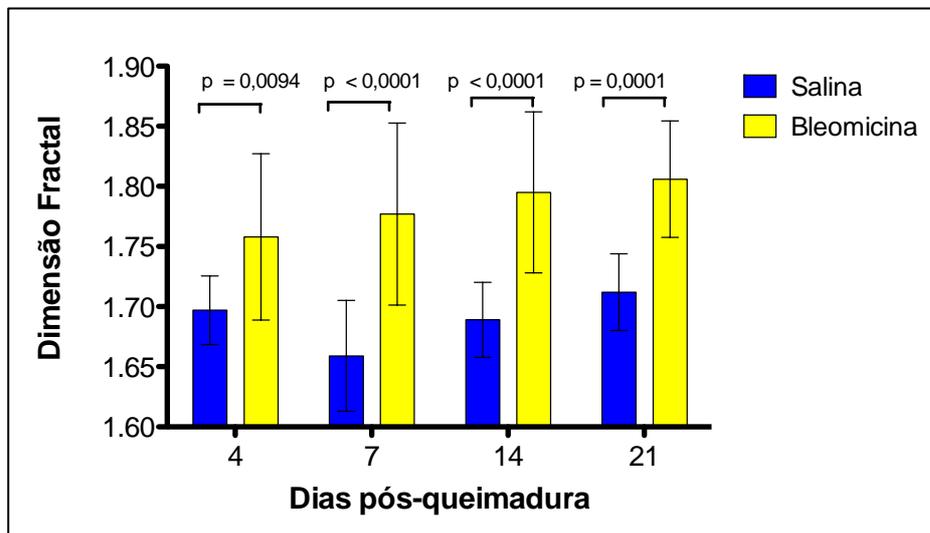


**Tabela 9** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo III (Col-3) nos diferentes tempos no grupo Bleomicina (BLEO).

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	1.734	1.610	1.637	1.700
Maximo	1.842	1.867	1.870	1.866
Média	1.810	1.758	1.777	1.795
Desvio Padrão	0.03494	0.06914	0.07576	0.06686
Erro padrão da média	0.01009	0.01996	0.02187	0.01930

Os valores médios da DF da organização do Col-3 foi mais elevada no grupo BLEO em todos os momentos comparados ao grupo SAL. O teste t mostrou diferenças significativas entre os dois grupos em todos os momentos: no d4  $p=0,0094$ ; em d7  $p=0,0003$ ; com  $p < 0,0001$  em d14 e  $p < 0,0001$  no d21 (Fig. 41 e Tab. 10).

**Figura 41** – Análise da dimensão fractal (DF) do colágeno tipo III (Col-3) nas queimaduras do grupo Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO) nos diferentes tempos do estudo. De acordo com o teste t de Student para amostras não emparelhadas, ocorreu diferença estatisticamente significativas intergrupos em todos os momentos (d4  $p = 0,0094$ ; d7  $p < 0,0001$ ; d14  $p < 0,0001$ ; d21  $p < 0,0001$ ).



**Tabela 10** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal (DF) da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	Grupos							
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	1,616	1,610	1,574	1,637	1,645	1,700	1,668	1,720
Percentil 25%	1,693	1,721	1,616	1,741	1,662	1,718	1,688	1,780
Mediana	1,700	1,762	1,669	1,797	1,689	1,829	1,704	1,799
Percentil 75%	1,714	1,815	1,692	1,842	1,713	1,853	1,743	1,849
Máximo	1,729	1,867	1,716	1,870	1,739	1,866	1,774	1,884
Média	1,697	1,758	1,659	1,777	1,689	1,795	1,712	1,806
Desvio Padrão	0,02852	0,06914	0,04612	0,07576	0,03127	0,06686	0,03192	0,04836
Erro Padrão da Média	0,008234	0,01996	0,01332	0,02187	0,009026	0,01930	0,009215	0,01396
IC 95% inferior	1,679	1,714	1,630	1,729	1,669	1,753	1,692	1,775
IC 95% superior	1,715	1,802	1,689	1,825	1,709	1,838	1,733	1,836

## 5.2 Lacunaridade (Lac) do colágeno

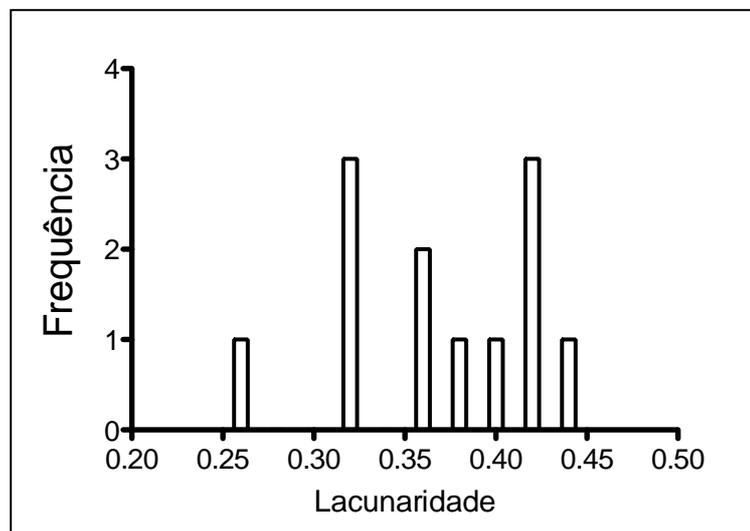
A quantificação semiautomatizada da lacunaridade (Lac) referente ao colágeno global e aos colágenos tipo I e tipo III em imagens digitais de lâminas coradas pelo vermelho de picrossirius (*Sirius Red F3BA*) sob polarização foi realizada com o auxílio do *plugin* FracLac do programa analisador de imagens ImageJ (RASBAND, 1997-2014), evidenciando diferentes valores de Lac em virtude dos diferentes padrões de organização das fibras colágenas (Col-G, Col-1 e Col-3) no grupo intacto (CTRL) e nos grupos queimados (SAL e BLEO), dependendo do tempo de observação.

Após a verificação da distribuição dos dados quanto à normalidade, foi realizada a análise estatística intragrupo da Lacunaridade do Col-1 e Col-3 das imagens obtidas dos grupos SAL e BLEO através da Análise de Variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*-, *1-way*), empregando-se o teste de Tukey *post-hoc*.

### 5.2.1 Lacunaridade (Lac) do colágeno global (Col-G)

A Lacunaridade média do Col-G no grupo Controle foi de 0,369 com desvio-padrão de 0,053614 (mínimo = 0,2642 e máximo= 0,438). O histograma de frequência e a estatística descritiva estão representados na figura 42 e tab 11 abaixo.

**Figura 42** – Histograma de frequência dos valores da lacunaridade do colágeno global na pele intacta.

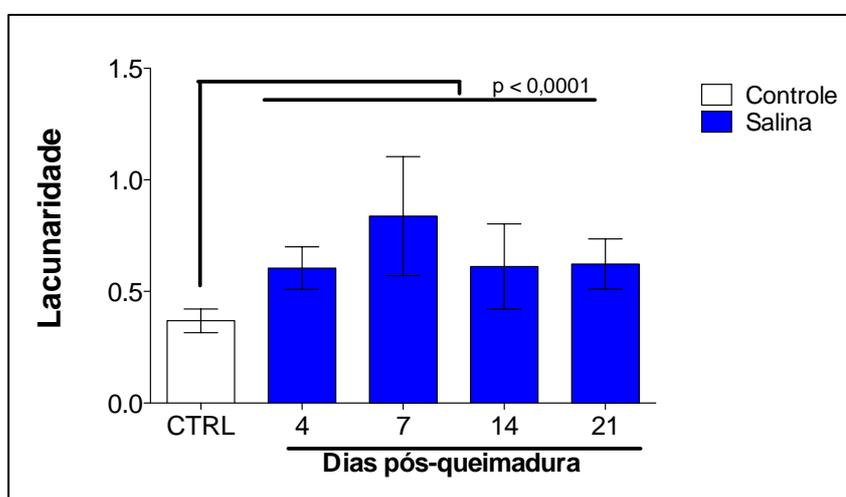


**Tabela 11** – Estatística descritiva dos valores da Dimensão Fractal do colágeno global no grupo intacto (CTRL).

<b>Estatísticas</b>	<b>Valores</b>
Número de imagens	12
Mínimo	0.2642
Percentil 25	0.320875
Mediana	0.37645
Percentil 75	0.416775
Máximo	0.438
Média	0.368642
Desvio-Padrão	0.053614
Erro Padrão da Média	0.015477
Intervalo de Confiança 95% inferior	0.334577
Intervalo de Confiança 95% superior	0.402706

Foi observado menor valor de lacunaridade nas imagens do grupo controle ( $0,3686 \pm 0,05$ ) quando comparada à lacunaridade média das imagens de queimaduras do grupo salina em todos os momentos (Fig 43). A lacunaridade aumentou no d4, pós-queimadura, atingindo valor máximo no d7 ( $0,7131 \pm 0,12$ ), voltando a cair progressivamente em d14 e d 21. Na análise intergrupos SAL e CTRL, a ANOVA 1 fator com o teste de comparações múltiplas de Dunnett mostrou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) em todos os momentos. Na análise intragrupo SAL pela ANOVA 1 fator não mostrou diferença significativa entre os diversos momentos ( $p = 0,1420$ ), sem aproximar-se do valor do CTRL (Tabela 12).

**Figura 43** – Lacunaridade do colágeno global no grupo Salina e Controle.

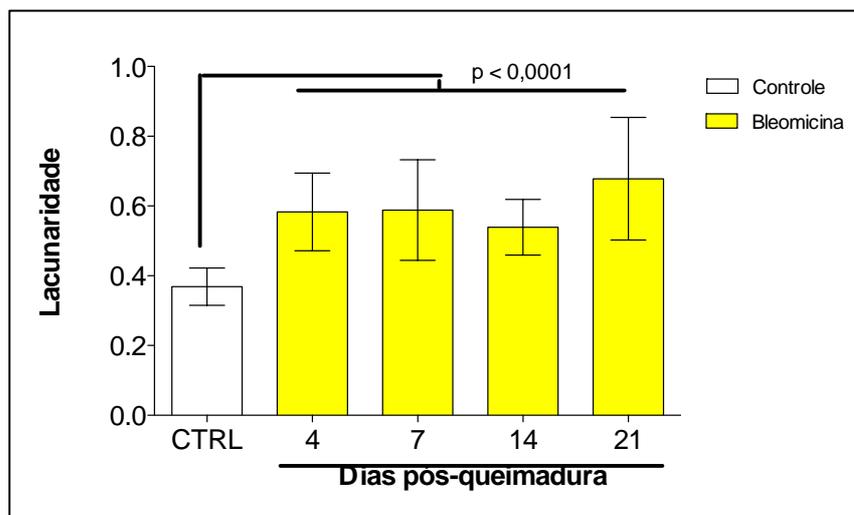


**Tabela 12** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno global nos diferentes tempos no grupo Salina (SAL).

	Dias pós-queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	0,4706	0,5351	0,4105	0,4889
Maximo	0,8094	1,395	1,065	0,9407
Média	0,6050	0,8378	0,6116	0,6231
Desvio Padrão	0,09514	0,2666	0,1908	0,1124
Erro padrão da média	0,02746	0,07695	0,05507	0,03245

Do mesmo modo, os valores médios da lacunaridade mensurada nas imagens do grupo bleomicina foram superiores ao do grupo CTRL em todos os momentos (fig 44). O maior valor médio da lacunaridade no grupo BLEO foi visto no D21 ( $0,6782 \pm 0,18$ ) e o valor médio mínimo deste grupo no D14 ( $0,5392 \pm 0,08$ ). Dentro do grupo BLEO a ANOVA 1 fator não mostrou significância estatística ( $p=0,0887$ ), tornando dispensável o teste de Tukey. Por outro lado, a ANOVA 1 fator mostrou diferenças significativas ( $p<0,0001$ ) entre o CTRL e o grupo BLEO em todos os momentos, com o teste de comparações múltiplas de Dunnett demonstrando menor diferença média ( $-0,1705$ ) entre CTRL e D14 (Tabela 13).

**Figura 44** – Lacunaridade do colágeno global no grupo Bleomicina e Controle.



**Tabela 13** –Estatística referente a lacunaridade do colágeno global no grupo Bleomicina.

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	0,3680	0,3996	0,4310	0,3624
Maximo	0,7519	0,7979	0,6484	0,8969
Média	0,5831	0,5882	0,5392	0,6782
Desvio Padrão	0,1112	0,1442	0,07973	0,1760
Erro padrão da média	0,03211	0,04162	0,02302	0,05079

Apesar dos valores médios mais elevados de Lacunaridade do Col-G no grupo SAL, a comparação intergrupos SAL x BLEO com o teste t de Student, exibiu diferença significativa apenas no d7 com  $p = 0,0092$  (Fig 45)

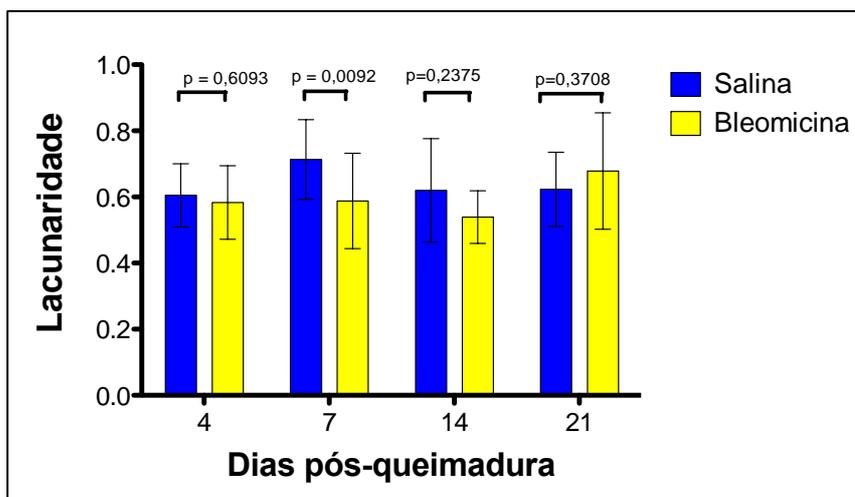
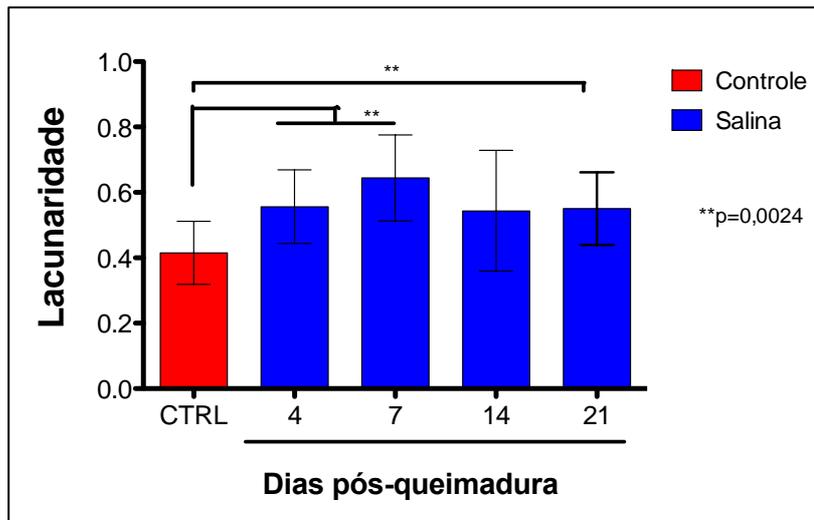
**Figura 45** – Comparação da Lacunaridade do colágeno global intergrupos Salina e Bleomicina.

Tabela 14 – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno global nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	Grupos							
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	0,4706	0,3680	0,5351	0,3996	0,4105	0,4310	0,4889	0,3624
Percentil 25%	0,5449	0,5227	0,6455	0,4731	0,4691	0,4734	0,5590	0,5632
Mediana	0,5797	0,5497	0,7804	0,5794	0,5557	0,5232	0,5987	0,6964
Percentil 75%	0,6606	0,6679	0,9040	0,7489	0,7313	0,6233	0,6502	0,8426
Máximo	0,8094	0,7519	1,395	0,7979	1,065	0,6484	0,9407	0,8969
Média	0,6050	0,5831	0,8378	0,5882	0,6116	0,5392	0,6231	0,6782
Desvio Padrão	0,09514	0,1112	0,2666	0,1442	0,1908	0,07973	0,1124	0,1760
Erro Padrão da Média	0,02746	0,03211	0,07695	0,04162	0,05507	0,02302	0,03245	0,05079
IC 95% inferior	0,5446	0,5124	0,6684	0,4966	0,4904	0,4885	0,5517	0,5664
IC 95% superior	0,6655	0,6538	1,007	0,6798	0,7329	0,5898	0,6945	0,7900

No que diz respeito à lacunaridade do Col-1, entre o grupo SAL e o CTRL ocorreram diferenças significativas ( $p=0,0024$ ). O teste de Tukey demonstrou que a diferença era significativa entre CTRL e D4, CTRL e D7 e novamente entre CTRL e D21. Dentro do grupo SAL não houve diferença significativa ( $p=0,2556$ ) na lacunaridade do Col-1 entre os diversos tempos (Fig. 46 e Tab. 15)

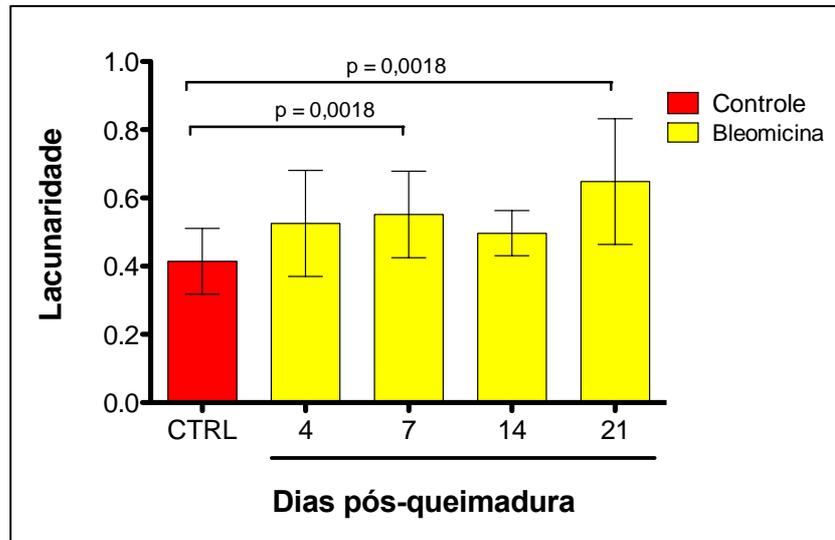
**Figura 46** – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Salina e Controle.



**Tabela 15** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes tempos no grupo Salina.

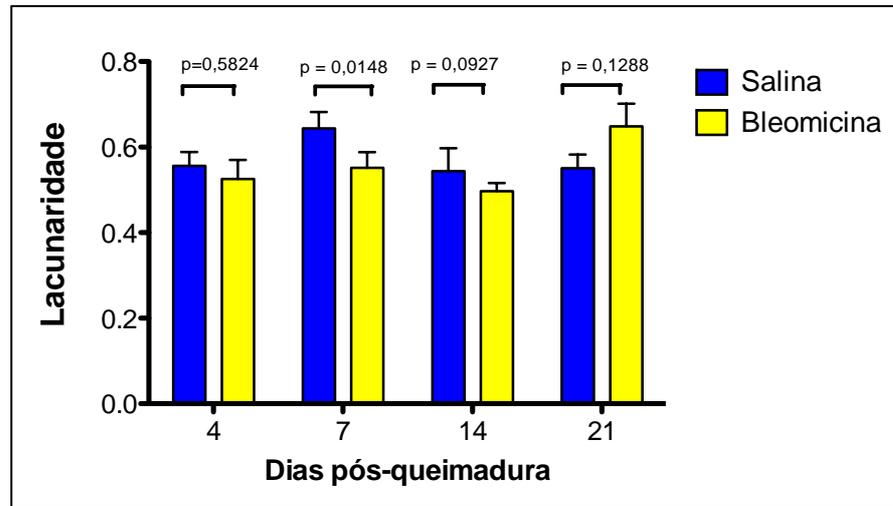
Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	0,3884	0,4488	0,3760	0,3818
Maximo	0,7652	0,8913	0,9849	0,7359
Média	0,5563	0,6441	0,5437	0,5506
Desvio Padrão	0,1127	0,1316	0,1849	0,1111
Erro padrão da média	0,03254	0,03798	0,05337	0,03208

A análise da lacunaridade do Col-1 intragrupo BLEO pela ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os diversos momentos ( $p = 0,5824$ ). Já na comparação intergrupos CTRL e BLEO a diferença foi significativa ( $p = 0,0018$ ) entre CTRL e d7 e novamente entre CTRL e d21 (Fig. 47 e Tab. 16).

**Figura 47** – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Bleomicina e Controle.**Tabela 16** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes tempos no grupo Bleomicina.

Estatísticas	Dias pós-queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	0,3785	0,3999	0,4140	0,4574
Maximo	0,9483	0,8320	0,6275	1,002
Média	0,5254	0,5518	0,4968	0,6482
Desvio Padrão	0,1552	0,1264	0,06630	0,1842
Erro padrão da média	0,04482	0,03648	0,01914	0,05317

O grupo SAL exibiu valores médios mais elevados de Lacunaridade do Col-1 do que o grupo BLEO até o d14, a relação se invertendo no d21 pós-queimadura. Entretanto, a comparação intergrupos SAL x BLEO com o teste t de Student, exibiu diferença significativa apenas no d7 com  $p = 0,0148$  (Fig 48 e tabela 17)

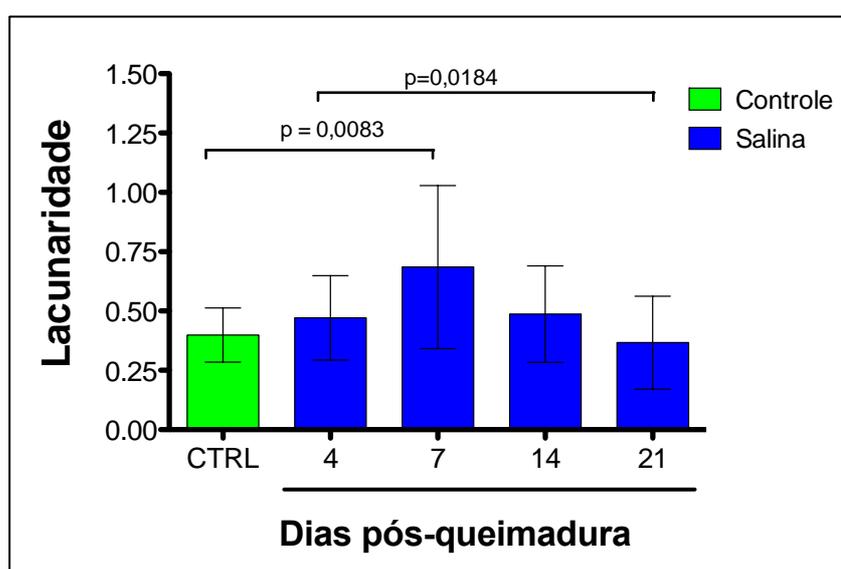
**Figura 48** – Lacunaridade do colágeno tipo I intergrupos Salina e Bleomicina.

**Tabela 17** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo I nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	0,3884	0,3785	0,4488	0,3999	0,4062	0,4140	0,4181	0,4574
Percentil 25%	0,4661	0,4191	0,5480	0,4663	0,4348	0,4333	0,4924	0,5133
Mediana	0,5572	0,5013	0,7394	0,5043	0,5539	0,4916	0,5493	0,5814
Percentil 75%	0,6021	0,5835	1,070	0,6034	0,7602	0,5458	0,6152	0,8310
Máximo	0,7652	0,9483	1,481	0,8320	0,9849	0,6275	0,6912	1,002
Média	0,5563	0,5254	0,8143	0,5518	0,5963	0,4968	0,5571	0,6482
Desvio Padrão	0,1127	0,1552	0,3196	0,1264	0,1847	0,06630	0,07834	0,1842
Erro Padrão da Média	0,03254	0,04482	0,09225	0,03648	0,05331	0,01914	0,02261	0,05317
IC 95% inferior	0,4847	0,4267	0,6112	0,4715	0,4790	0,4546	0,5073	0,5312
IC 95% superior	0,6279	0,6240	1,017	0,6321	0,7137	0,5389	0,6068	0,7652

No que diz respeito à lacunaridade do Col-3 no grupo SAL, esta aumentou entre d4 e d7, a seguir diminuindo progressivamente de d7 até o d21. A comparação intragrupo retornou uma probabilidade de significância  $p=0,0184$  entre d7 e d21, mostrando que houve diferença estatisticamente significativa dentro do grupo. Na comparação intergrupo CTRL e SAL, ocorreu diferença significativa ( $p=0,0083$ ), com o pós-teste de Dunnett revelando que a diferença encontra-se entre CTRL e d7 (Fig. 49 e Tab. 18).

**Figura 49** – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Salina e Controle.



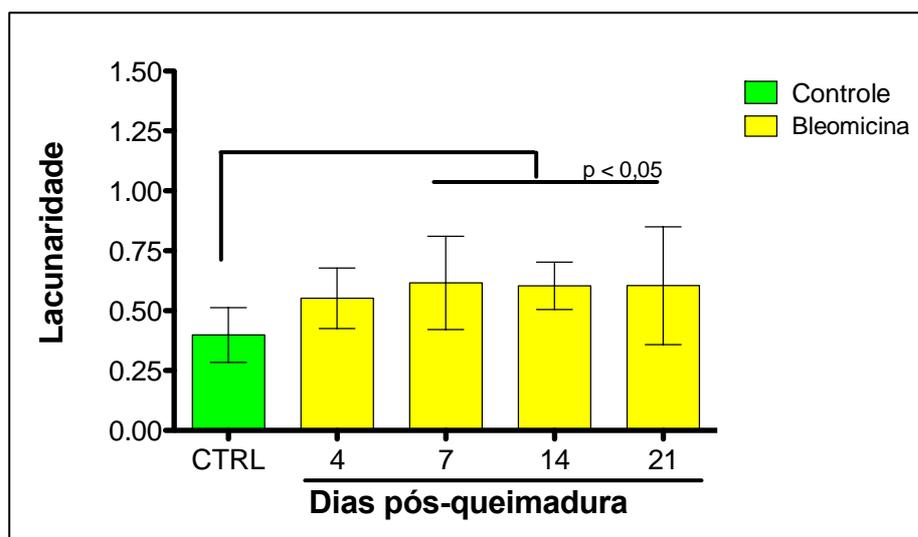
**Tabela 18** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes tempos no grupo Salina.

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Minimo	0,2028	0,2000	0,1916	0,1780
Maximo	0,7093	1,254	0,7824	0,6568
Média	0,4709	0,6852	0,4870	0,3666
Desvio Padrão	0,1777	0,3435	0,2037	0,1959
Erro padrão da média	0,05131	0,09916	0,05880	0,05655

Na comparação intergrupos CTRL e BLEO da lacunaridade média do Col-3 ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0109$ , ANOVA), com o pós-teste de Dunnett mostrando que as diferenças eram significativa em todos os

momentos, exceto no d4 pós-queimadura. A lacunaridade aumentou entre d4 4 d7 dentro do grupo BLEO, permanecendo em níveis similares nos demais momentos. A análise intergrupo pela ANOVA não demonstrou diferença estatisticamente relevante com  $p=0,8121$  (Fig. 50 e Tab. 19).

**Figura 50** – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Bleomicina e Controle.

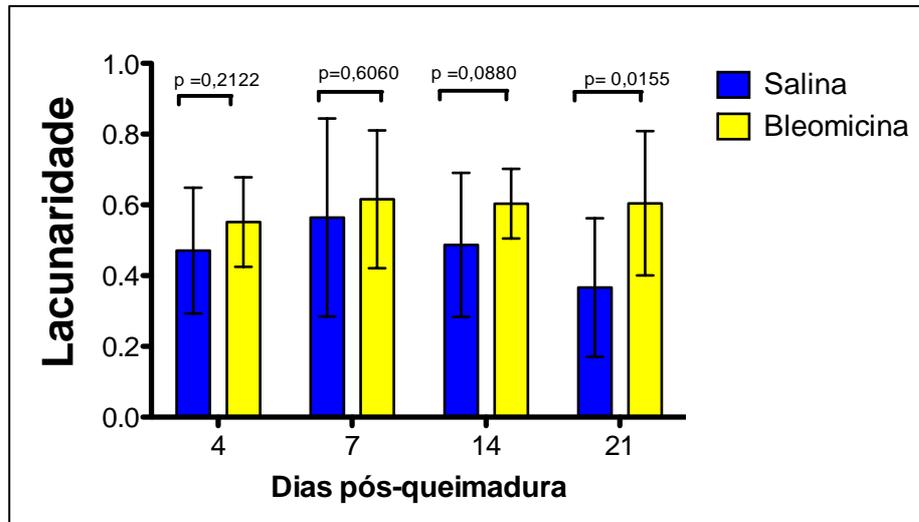


**Tabela 19** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes tempos no grupo Bleomicina.

Estatísticas	Dias pós queimadura			
	4	7	14	21
N	12	12	12	12
Mínimo	0,3999	0,2597	0,3977	0,0249
Máximo	0,8320	0,8964	0,7774	0,8717
Média	0,5518	0,6160	0,6037	0,6046
Desvio Padrão	0,1264	0,1945	0,09866	0,2458
Erro padrão da média	0,03648	0,05615	0,02848	0,07095

A figura 48 abaixo mostra aparentemente valores médios de lacunaridade do Col-3 mais elevados no grupo BLEO. Entretanto, na comparação entre os grupos SAL e BLEO nos diversos momentos, o teste t mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0155$ ) somente no D21 (Fig. 51 e Tab. 20).

**Figura 51** – Lacunaridade do colágeno tipo III intergrupos Salina e Bleomicina.

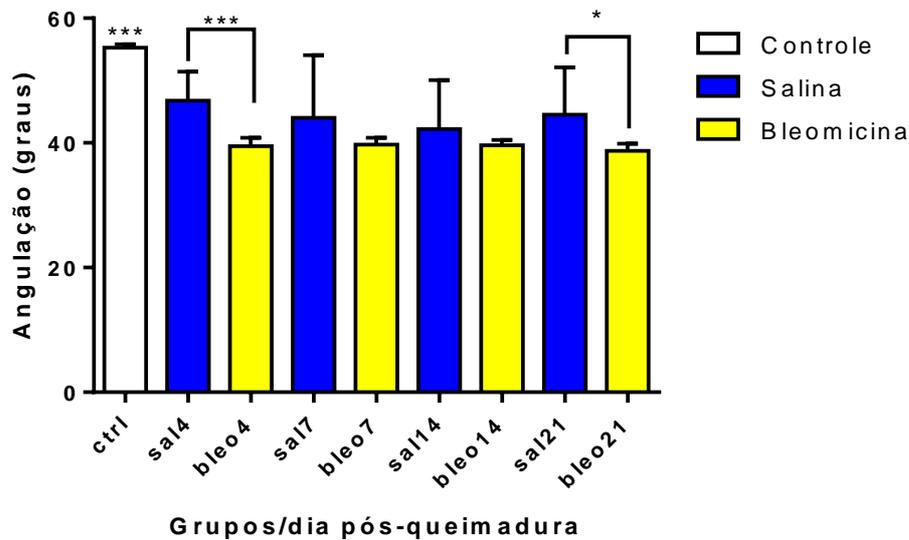


**Tabela 20** – Estatística descritiva dos valores da lacunaridade da organização do colágeno tipo III nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	Grupos							
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	0,2028	0,3999	0,2000	0,2597	0,1916	0,3977	0,1780	0,0249
Percentil 25%	0,2695	0,4663	0,2092	0,4247	0,2801	0,5364	0,1869	0,4504
Mediana	0,5084	0,5043	0,6783	0,6851	0,4955	0,6082	0,2684	0,6472
Percentil 75%	0,5869	0,6034	0,7933	0,7133	0,6671	0,6608	0,5659	0,7968
Máximo	0,7093	0,8320	0,9104	0,8964	0,7824	0,7774	0,6568	0,8717
Média	0,4709	0,5518	0,5645	0,6160	0,4870	0,6037	0,3666	0,6046
Desvio Padrão	0,1777	0,1264	0,2799	0,1945	0,2037	0,09866	0,1959	0,2458
Erro Padrão da Média	0,05131	0,03648	0,08079	0,05615	0,05880	0,02848	0,05655	0,07095
IC 95% inferior	0,3580	0,4715	0,3866	0,4924	0,3576	0,5410	0,2421	0,4484
IC 95% superior	0,5839	0,6321	0,7423	0,7395	0,6164	0,6664	0,4910	0,7607

No que diz respeito à análise da orientação (angulação) do colágeno com relação à epiderme, a ANOVA mostrou que houve diferença extremamente significativa entre os valores dos animais controle – não submetidos a queimadura –, comparando-se todos os momentos dos grupos pós-queimaduras independentemente do grupo de tratamento (Fig. 52 e Tab. 27). Na comparação intergrupos SAL e BLEO, nos respectivos momentos, o teste T para amostras independentes mostrou diferença bastante significativa no d4 pós-queimadura ( $p = 0,0002$ ) e no d 21 ( $p = 0,239$ ), sem diferença entre os grupos no d7 e d14, como graficamente demonstrado na fig. 521 abaixo.

**Figura 52** – Orientação do colágeno global intergrupos Controle, Salina e Bleomicina.



**Tabela 21** – Estatística descritiva dos valores da angulação (organização) do colágeno com relação à epiderme nos diferentes momentos nos grupos Salina (SAL) e Bleomicina (BLEO).

Valores	Dias pós-queimadura							
	4		7		14		21	
	Grupos							
	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO	SAL	BLEO
N	12	12	12	12	12	12	12	12
Mínimo	54,55	37,65	37,86	27,90	38,01	26,87	38,37	34,07
Percentil 25%	54,74	42,49	38,52	33,99	39,05	34,69	38,85	38,59
Mediana	55,42	47,79	39,34	44,60	39,64	44,43	39,51	44,75
Percentil 75%	55,73	50,16	39,83	52,75	40,80	48,79	40,21	48,86
Máximo	56,18	53,80	42,79	57,80	41,27	52,57	41,37	61,13
Média	55,30	46,75	39,46	44,03	39,71	42,24	39,61	44,52
Desvio Padrão	0,5418	4,657	1,341	10,02	1,095	7,849	0,8765	7,625
Erro Padrão da Média	0,1564	1,344	0,3871	2,893	0,3160	2,266	0,2530	2,201
IC 95% inferior	54,95	43,79	38,61	37,67	39,02	37,25	39,05	39,68
IC 95% superior	55,64	49,71	40,31	50,40	40,41	47,22	40,17	49,37

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Da escolha do tema

No decorrer dos últimos cinquenta anos, o aumento progressivo nas taxas de sobrevivência de vítimas de queimaduras, acidentais ou não, tem desafiado as equipes envolvidas neste tipo de trauma a desenvolverem técnicas e estratégias de atendimento buscando simultaneamente preservar a vida, a função e a estética durante o período de recuperação (CHAPMAN, 2007).

Cicatrizes cutâneas disfuncionais ou inestéticas são as complicações mais relevantes nos sobreviventes de queimaduras, perdurando, por vezes, pelo resto de suas vidas. Enquanto em fetos uma lesão é curada por regeneração, formando tecido estrutural e funcionalmente idêntico ao original, nas demais situações o tecido lesionado é reparado pelo organismo formando uma cicatriz com propriedades estruturais e funcionais inferiores ao tecido original (LAWRENCE; FAUERBACH; THOMBS, 2006; KLEIN *et al.*, 2011; HUNTER *et al.*, 2013; RUSSEL *et al.*, 2013).

A cicatrização cutânea não-patológica deixa uma cicatriz esteticamente aceitável e restaura a integridade anatômica e funcional da pele, embora dissimilar ao tecido original. Nesta situação, o metabolismo do colágeno apresenta um equilíbrio dinâmico entre as fases de síntese, pela ação da prolina-hidroxilase, e a degradação pelas metaloproteinases, principalmente pela colagenase (PEACOCK, 1984). Em alguns indivíduos tal equilíbrio é rompido, resultando uma cicatriz patológica ou inestética. A cicatrização dita patológica pode ser subdividida em excessiva ou insuficiente. Na patológica excessiva existe uma superprodução de tecido cicatricial (queloides, hipertróficas, bridas, contraturas). Na insuficiente existe um déficit, como nas feridas crônicas e instáveis (RODAS ESPINOZA *et al.*, 2011].

As cicatrizes patológicas subsequentes à injúria térmica envolvendo o sistema tegumentar (bridas, contraturas, cicatrizes hipertróficas e, menos frequentemente, queloides) podem ser coletivamente denominadas cicatrizes cutâneas pós-queimaduras (CCPQ) (TREDGET, 2007; MESQUITA, 2010). Um estudo epidemiológico realizado na Itália por Gangemi e colaboradores (2008) buscou identificar fatores de risco para o desenvolvimento de cicatrizes patológicas pós-queimaduras. Foram incluídos 703 pacientes com 2.240 sítios anatômicos

diferentes de queimaduras vistos em um ambulatório de queimados na cidade de Turim entre janeiro de 1994 e maio de 2006. CCPQ foram encontradas em 540 pacientes (77%), sendo que 44% tinham cicatrizes hipertróficas (CH), 5% de contraturas e 28% de cicatrizes hipertróficas-contraídas (bridas). As CH surgiam por volta de 23 dias após a reepitelização. Os autores identificaram como fatores de risco independentes: sexo feminino, jovens, queimaduras no pescoço e/ou membros superiores, múltiplas cirurgias e o uso de enxerto de pele em malha (*mesh-graft*).

Em termos histológicos, nas cicatrizes não-patológicas as fibras colágenas arranjam-se em feixes hialinos finos, não paralelos à superfície cutânea, enquanto nas cicatrizes patológicas excessivas as fibras colágenas apresentam um padrão nodular e se agrupam em bandas ou feixes espessos, compactos, hialinizados e paralelos à superfície, com poucas estruturas anexas. Quando os nódulos de condensação ocupam a derme papilar, a epiderme suprajacente pode se apresentar sobrelevada (COLUCCI; FRANCO, 2003).

Na etiopatogenia da CCPQ foram identificados vários fatores, como sexo, idade e status imunológico da paciente, localização e extensão da queimadura, ocorrência de complicações como infecção, hematoma e/ou seroma sub-enxerto com descolamento ou perda do mesmo (GANGEMI *et al.*, 2008; HERNDON, 2012). A hipótese mais aceita atualmente como etiologia das CCPQs diz que a CH é uma doença inflamatória sistêmica de origem central que sofre influência e é regulada por fatores locais (STELLA *et al.*, 1998; GANGEMI *et al.*, 2008; HERNDON, 2012). Vários trabalhos tem corroborado tal hipótese, apontando linfócitos e o sistema imune da pele como responsáveis pela manutenção do estado inflamatório contínuo do tecido hipertrófico (CASTAGNOLI *et al.*, 1990; CRACCO *et al.*, 1992; TAKABAYASHI, 2005; NIESSEN *et al.*, 1999; KLEIN *et al.*, 2006; PADFIELD *et al.*, 2006; de MESQUITA, 2010).

Cicatrizes de queimaduras exercem uma influência dramática na qualidade de vida dos pacientes, tendo sido associadas à ansiedade, fobia social, depressão, distúrbios do sono, queda da produtividade e absenteísmo do trabalho, além da dificuldade do retorno a atividades habituais e à vida laboral mesmo após reabilitação (MUSTOE *et al.*, 2002; RUMSEY; CLARKE; WHITE, 2003; HERNDON, 2012).

Para além de sua ocorrência frequente, ainda não existe uma terapia efetiva e definitiva para as CCPQs. Nas bridas e contraturas estabelecidas, assim

como em quelóides e algumas cicatrizes hipertróficas, impõe-se o tratamento cirúrgico através da ressecção seguida de enxerto ou retalho de pele local ou à distância e, nos casos mais complexos, retalhos livres (MUSTOE *et al.*, 2002). Nas CCPQs mais simples pode ser tentado o uso de malhas compressivas, silicone na forma de creme ou gel adesivo, imiquimode tópico, terapia a laser, crioterapia ou infiltração intralesional de triancinolona, interferon alfa e gama, inibidores da prolina, antifator de crescimento, minoxidil, pentoxilfilina, e bleomicina, dentre outros agentes (BARRON, 1956; ALHADY; SIVANANANTHRAJAH, 1969; GOLD, 1994; HENNING; ROSKAM; VAN GERMET, 1986; MUTI; PONZIO, 1983; BOHDOKH; BRUN, 1996).

Quanto ao tratamento farmacológico, como visto acima, diversas drogas têm sido empregadas no combate às CCPQ, muitas vezes com resultados pouco significativos. Apesar dos resultados favoráveis em cirurgia eletiva, a modulação da resposta imuno-inflamatória ao trauma (REMIT) ainda não é uma realidade no trauma acidental.

A multiplicidade de tratamentos propostos para CCPQ demonstram que esta é uma afecção de difícil resolução, envolvendo, na maioria das vezes, a necessidade de reintervenções cirúrgicas e terapias combinadas, com respostas variáveis e frequentemente insatisfatórias.

No que diz respeito à avaliação e classificação das CCPQ, as escalas mais utilizadas se baseiam em critérios estritamente qualitativos, podendo variar na dependência da experiência do examinador, na sensibilidade e capacidade da paciente em relatar, suportar e/ou quantificar a dor ou a deformidade presente. A demanda por métodos quantitativos em pesquisa médica, assim como a tradução dos dados de bancada à clínica permanecem na ordem do dia. A disponibilidade de métodos computacionais de avaliação tem passado de promessas à realidade prática. Neste horizonte, métodos tradicionais como a histometria e morfometria tem ganhado destaque quando associados a técnicas de computação gráfica. Do mesmo modo, metodologias não lineares de mensuração da resposta biológica como dimensão fractal e lacunaridade tem recebido destaque na pesquisa biomédica. A identificação do ponto de reparação ou estágio cicatricial no qual se encontra uma queimadura, poderia favorecer a escolha da terapêutica cirúrgica ou farmacológica que possa minimizar a REMIT e/ou a resposta fibrótica.

O Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará estabeleceu uma linha de pesquisa voltada para o estudo integrado de

biomecânica e metabolismo no trauma, incentivando o uso de metodologia quantitativa e a pesquisa multi- e transdisciplinar. Assim, pareceu pertinente e relevante o estudo computadorizado de imagens digitais de queimaduras obtidas em modelo de experimentação animal já validado. A presente pesquisa buscou avaliar a resposta fibrótica cicatricial de queimaduras por métodos quantitativos, nomeadamente o índice de alinhamento do colágeno, análise da dimensão fractal e lacunaridade.

## 6.2 Do modelo experimental

Uma das características essenciais a qualquer protocolo experimental é controlar ou minimizar o número de variáveis que possam afetar a reação orgânica do indivíduo que é submetido a uma intervenção. O uso de modelos animais de doenças é uma forma aceita de se estabelecer técnicas cirúrgicas ou testar drogas que poderão beneficiar o ser humano.

A concepção e implementação de um modelo animal de CCPQ capaz de simular aquelas que ocorrem em humanos é tarefa árdua e, frequentemente, inglória, já que a indução da fibrose é em si um fator limitante e controverso. Apesar da inexistência de quelóides em outras espécies que não a humana este tipo de cicatriz patológica também é incomum em queimaduras (GANGEMI *et al.*, 2008). Os modelos disponíveis buscam induzir a fibrose pelo não tratamento, por radio-exposição ou através da simulação de aderências com cola de fibrina. Os resultados variam na graduação da resposta, no tempo de aparecimento e no estabelecimento das variáveis que caracterizam uma contratatura.

A pele humana recém-excisada em cirurgias plásticas ou proveniente de membros amputados ou ainda mesmo *post-mortem* seria, em tese, uma fonte aceitável de tecido para experimentação. Entretanto, tal uso está limitado pela pouca disponibilidade de pele e pela variabilidade de idade, gênero, raça ou sítio anatômico da amostra dos doadores. Ademais, há de se levar em conta as restrições éticas e médico-legais com relação a experimentação *in anima nobile*.

Historicamente, nos estudos experimentais envolvendo queimaduras uma ampla gama de espécies animais tem sido utilizadas: camundongos, ratos, cobaias (porquinhos-da-india) ou coelhos (WALKER; MASON, CCCC; CONVERSE *et al.*, 1965; DeCAMARA *et al.*, 1982; KAUFMAN *et al.*, 1990; KNABL *et al.*, 1999; SINGER

*et al.*, 2000; MESQUITA *et al.*, 2010). Alguns autores alegam que porcos guardam maior similaridade anatômica e estrutural (mosaico, espessura) com a pele humana que as demais espécies, além de ser grande o bastante para criar múltiplas queimaduras (DOUGLAS, 1972; MEYER *et al.*, 1978; PADDOCK *et al.*, 2003]. Embora a espessura da epiderme de porcos (70-140 micra) seja similar à humana (50-120 micra), a densidade vascular na derme papilar é muito menor em porcos do que em humanos, o que poderia diminuir a dissipação do calor em uma queimadura. Ademais, a maioria das queimaduras porcinas experimentais é realizada na pele da região para-espinal, que é bastante espessa em vez da região ventral que se aproxima mais da espessura da pele humana (MEYER *et al.*, 1978; BRANS *et al.*, 1994; NANNEY *et al.*, 1996; PADDOCK *et al.*, 2003). Embora o *turnover* dos pelos em porcos seja similar aos humanos e mais dissimilar que na pele murina, a pele porcina não possui glândulas sudoríparas apócrinas, as quais contem na sua base células troncos que participam no processo de regeneração da pele.

Um dos elementos essenciais no processo de reparo cicatricial de qualquer etiologia são os Mastócitos. Mastócitos, junto com os demais basófilos são células granulares que se coram metacromaticamente com corantes básicos. Os mastócitos são derivados de células tronco multipotentes da medula óssea, sendo que seus precursores migram para o sangue e outros tecidos, aparecendo como linfócitos não-granulados. Mastócitos maduros não circulam, vivem por longo tempo, retêm a sua capacidade proliferativa, sendo encontrados dispersos no tecido conjuntivo da pele, próximo a a pequenos vasos, principalmente na derme superficial (SIRAGANIAN, 1994; CHURCH; CLOUGH, 1999).

O trauma térmico causa degranulação dos mastócitos com liberação de histamina (FRIEDEL *et al.*, 1989). Em humanos os mastócitos são classificados de acordo com as proteases presentes em seus grânulos. Mastócitos que estocam triptase (alfa e beta) são chamados de mastócitos T (mast cell T, MCt) enquanto os que estocam quimase e triptase em seus grânulos são classificados como mastócitos CT (mast cell CT- MCct) (IRANI *et al.*, 1986). Diferentemente da pele humana, os mastócitos da pele porcina não contém quimases, o que pode alterar a sensibilidade de ativação dos mastócitos e alterar o perfil de mediadores inflamatórios que são liberados. Por outro lado, foram descritos em roedores os CTMCs (*connective tissue mast cells* [mastócitos do tecido conjuntivo]), presentes na pele e cavidade peritoneal similares aos humanos. Os CTMCs contém em seus

grânulos duas triptases (mMCP-6 e mMCP-7) e quimases ligadas à heparina e uma carboxipeptidase (METCALFE *et al.*, 1997; WELLE, 1997; GALLI *et al.*, 2005). Baseado em suas sequências, a quimase mMCP-5 de camundongo é o homólogo estrutural mais próximo da quimase humana enquanto a mMCP-4 é o homólogo funcional mais próximo do humano (SANTANA, 2014).

De acordo com Santana (2014), estudos mostram uma correlação positiva entre a presença de quimase e fibrose em modelos de diabetes realizados por Jones e colaboradores (2004) e na fibrose hepática autoimune (SATOMURA *et al.*, 2003). Por sua vez, Shiota e colaboradores (1997) demonstraram que a quimase encontra-se ativada na fibrose ventricular presente no estágio cônico da hipertensão induzida por clipagem do pedículo renal bilateralmente em Hamsters mantidos por 16 ou 32 semanas. Embora ainda se desconheça o(s) mecanismo(s) pelo qual a quimase contribui para a fibrose, pesquisadores demonstraram experimentalmente que a inibição da quimase pode reduzir a fibrose em modelos animais.

Takai e colaboradores (1997) investigaram o papel da quimase vascular na fisiopatologia da aterosclerose na aorta de macacos. Em macacos alimentados com uma dieta rica em colesterol por seis meses ocorreu degeneração aterosclerótica significativa na aorta torácica, com níveis de mRNA de da quimase 3 vezes maior que nos animais que receberam dieta padrão e não apresentaram aterosclerose. O uso de um antagonista do receptor da angiotensina 2 (Ang II) preveniu a formação de lesões ateroscleróticas. Seus achados sugerem uma aterosclerose via Ang-II quimase dependente.

Tomimori e colaboradores (2003), estudaram um modelo murino de fibrose pulmonar. Instilaram bleomicina intratraqueal em camundongos, provocando um aumento dose-dependente do conteúdo de hidroxiprolina e da atividade da quimase. Tal efeito foi revertido pela administração do inibidor de quimase SUN C8077. Seus achados sugerem que a quimase de mastócitos participa na patogênese da fibrose pulmonar, talvez mediada pela TGF-beta-1.

Sakaguchi e colaboradores [2004], utilizaram o mesmo método de indução de fibrose pulmonar (bleomicina intratraqueal) empregando Hamsters. Como inibidor da quimase empregaram o NK3201. Quatro semanas após a indução da fibrose, a proporção entre área fibrótica e área pulmonar total foi menor nos animais tratados com o inibidor da quimase via oral com relação aos placebo-tratados. Okamoto, Takai e Yamazaki (2002) já haviam demonstrado a eficácia do

NK3201 via oral em reduzir aderência peritoneal induzida por escarificação uterina em Hamsters.

Por ocasião da queimadura cutânea, os mastócitos não-lesados e estressados pelo efeito de vizinhança são ativados, o que culmina na liberação de uma ampla gama de mediadores da inflamação (METCALFE *et al.*, 1997). Três classes distintas de mediadores são liberados: os pré-formados (hhh) estocados nos grânulos citoplasmáticos; os neoformados, derivados de precursores lipídicos da membrana plasmática e corpos lipídicos (Leucotrienos e prostaglandinas pró- e antiinflamatórias) e os mediadores neo-sintetizados após a ativação transcricional, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1, -4, -5, -6 e IL-10 (associadas à resposta Th2), IFN-gama, IL-2, -3, -12, IL-18 e TNF-alfa (associados à resposta Th-1) e quimiocinas CCL5 e CXL8 (GALLI *et al.*, 1999; STINCHCOMBE; GRIFFITHS, 2001).

Alguns destes mediadores pré-formados presentes nos grânulos dos mastócitos (dentre eles a histamina, serotonina, dopamina, serglicina, quimase, triptase, carboxipeptidase, heparanase, granzima, catepsina e peroxidase) também são produzidos por outras linhagens celulares como fibroblastos, macrófagos, endoteliócitos e linfócitos.

Mastócitos exercem papel importante tanto na inflamação aguda quanto nas fases mais tardias do reparo cicatricial em queimaduras. Dong e colaboradores (2013) estudaram o envolvimento das quimases de mastócitos na cicatrização de queimaduras em hamsters. Vinte e oito animais foram submetidos a queimadura profunda de espessura parcial no dorso e a seguir divididos randomicamente em dois grupos: o grupo controle recebeu 1 mL de salina v.o e o outro grupo recebeu cetotifeno (4mg/Kg v.o), um estabilizador de membrana de mastócitos administrado 1 x /dia dois dias antes e dois dias após a queimadura. Demonstraram que as concentrações de Ang II, TGF-beta-1, colágeno I e III e IL-1-beta eram significativamente menores no grupo tratado com cetotifeno. Embora não tenham ocorrido diferenças na apoptose de fibroblastos entre os dois grupos, os autores concluíram que a quimase tem papel importante na cicatrização de queimaduras, especialmente nos estágios mais avançados do processo de reparo.

O envolvimento da quimase na remodelação da matriz tissular tem sido sugerido devido a sua capacidade de ativar a pro-colagenase e degradar a MEC (VARTIO; SEPPÄ; VAHERI, 1981; SAARINEN *et al.*, 1994). Uma das funções maiores da quimase é converter a Ang I em Ang II. A Ang II já é reconhecida como

fator de crescimento, regulando o crescimento celular, angiogênese, inflamação, reparo e remodelação tissular (CHEN *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a ação redutora de indicadores de fibrose em queimaduras pela bleomicina, administrada em dose única, imediatamente após a queimadura, poderia ser explicada por uma ação dual. A bleomicina é um quimioterápico potente amplamente usado em oncologia assim como no tratamento de processos fibróticos como queloides e fibrose traqueal. Isolada a partir de um fungo existente no solo (*Streptomyces verticillus*), consiste em uma mistura de polipeptídeos citotóxicos com propriedades antibacterianas, antivirais e antitumorais. Seu mecanismo de ação ocorre pela transferência de um elétron de ferro a uma molécula de oxigênio, criando um radical livre de oxigênio (ROS). Neste processo estão implicados outros ions metálicos como cobalto, níquel, manganês e cobre. Aplicada de forma intralesional, em doses total menor que 5 mg, tem sido utilizadas no tratamento de verrugas recalcitrantes, doença de Bowen, carcinomas de células escamosas e basocelulares e hemangiomas. Embora seu mecanismo de ação na pele ainda nao esteja totalmente elucidado, existem evidências de que a bleomicina aumente a disponibilidade local de TNF. Imediatamente após a aplicação da bleomicina ocorre eritema, edema, dor e queimação, corroborando seu efeito inflamatório. O efeito indutor da fibrose pulmonar pela bleomicina, de acordo com Peng e colaboradores (2013) talvez se deva ao efeito cumulativo das aplicação repetida da droga, com o status inflamatório perdurando até fases mais tardias do reparo, enquanto quando aplicada em dose única desencadeia uma intensa reação inflamatória local, consistindo em neutrófilos recolhidos no lavado bronco-alveolar (LBA), que é rapidamente suplantada no decorrer do tempo, aumentando o numero de linfócitos e macrófagos na via aérea. Após 35 dias da aplicação o numero de células no LBA de camundongos trtados com bleomicina retorna ao nível observado nos animais tratados com salina, com exceção do número de linfócitos.

Obviamente, cada um destes modelos animais possui vantagens e desvantagens. Discutir todas elas individualmente encontra-se além do escopo do presente estudo. Quanto ao suíno, apesar do seu grande porte permitir realizar muitas queimaduras no mesmo animal, podendo reduzir a variação inter-indivíduos, o porte do suíno requer instalações maiores e sofisticadas, maior custo de manutenção, além de médico veterinário com experiência anestésica, o que aliado à

maior dificuldade de sua obtenção, padronização e maior custo tornam-no menos viáveis como modelo neste tipo de experimento.

Nos conceitos atuais de bioterismo, espécies convencionais de laboratório são aqueles animais produzidos e criados sob condições ideais, mantidos em ambiente controlado, com acompanhamento microbiológico e genético seguros, sendo submetidos a monitoração regular com fins de experimentação (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MAJEROWICZ, 2005).

De acordo com os objetivos propostos em determinado estudo experimental, é desejável que o modelo animal guarde uma semelhança geral no que concerne a aspectos anatômicos e fisiológicos, possua porte adequado e seja de fácil obtenção e manejo, além de outras características como docilidade, prolificidade e ciclo reprodutivo curto (ANDRADE; OLIVEIRA; PINTO, 2002).

O camundongo, membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*, é um animal de laboratório dos mais utilizados em experimentação animal, justamente por ser pequeno, muito prolífero, período de gestação curto, de fácil domesticação e manutenção, sendo o mamífero mais utilizado (SANTOS, 2002b). O camundongo selvagem vive cerca de 2 a 3 anos enquanto o de laboratório vive cerca de 1 ano, talvez devido ao alto número de cruzamentos consanguíneos que poderiam diminuir sua imunidade ou potencializar suscetibilidades ou doenças genéticas. A semelhança genética entre camundongos e humanos chega a 99%. Talvez devido a este fato, camundongos respondam por 97% dos animais utilizados em pesquisas envolvendo vacinas, medicamentos ou cosméticos (FOSTER; SMALL; FOX, 1983; CHORLLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Devido à esta realidade biológica, no presente estudo optou-se pela utilização de imagens de queimaduras provocadas em camundongo, com a assunção prévia que até eventuais alterações sutis na fibrose cicatricial no curto prazo poderiam ser indicadores confiáveis de avaliação.

O camundongo preencheu largamente os requisitos desta pesquisa, de acordo com o estudo piloto prévio e os propósitos do estudo de Muniz (2012), mostrando-se um modelo adequado por diversas razões elencadas a seguir:

- 1) foram empregados animais de uma mesma colônia, com cruzamentos consanguíneos aleatórios, o que confere uma maior resistência à

doenças sem interferir significativamente com a variabilidade genética individual (MAJEROWICZ, 2005);

- 2) o camundongo possui certa similaridade histológica com a pele humana, sendo um modelo bastante empregado em estudos de toxicologia, de cicatrização cutânea e em dermatologia (SUEKI; GAMMAL; KLIGMAN, 2000);
- 3) utilizou-se exclusivamente animais machos, com cerca de três a seis meses de vida, buscando evitar a variação hormonal, já que a idade e a presença de receptores estrogênicos na pele pode alterar significativamente a espessura cutânea e o processo de cicatrização (HASSELQUIST e cols, 1980; CALVIN e cols. 1998; SHAN; MAIBACH, 2001);
- 4) o porte e a idade dos animais utilizados (~50 g) permitiu a realização de uma técnica anestésica e cirúrgica padronizada e de rápida realização (em média de 5 minutos para a indução anestésica e de 2 minutos para realizar as duas queimaduras);
- 5) o porte dos animais também permitiu a acomodação dos mesmos em gaiolas individuais, dentro do mesmo ambiente climatizado, evitando canibalismo e minimizando a quantidade de cuidadores em contato com estes animais, o que possivelmente contribuiu para minimizar o estresse e evitar a ocorrência de doenças dentro dos prazos estipulados (1 a 3 semanas de estudo) e, finalmente e não menos importante;
- 6) após pesquisa de preços, de prazos de obtenção e eventual reposição, o custo efetivo/animal mostrou-se muito mais barato e rápido de obter-se que coelhos, suínos ou mini-pigs (*sus scrofa*).

A pele do camundongo de maneira similar à humana, tem porções hirsutas e glabras, possuindo camadas diversas, cada uma destas exibindo uma diferente composição molecular (MENDENHAL, 1999). A camada mais externa da pele é a epiderme, composta por diferentes estratos (de 1 a 2 camadas), cuja espessura relativa varia de acordo com a região da superfície corporal e com o estágio de crescimento dos pelos (fase anágena, telógena ou catágena). De maneira geral, a epiderme é mais delgada em áreas pilosas exibindo uma camada córnea,

composta de queratina no estado de alfa-hélice, mais espessa nas áreas glabras (coxins plantares e área perinasal). As células da epiderme são de quatro tipos distintos, sendo composta principalmente de ceratinócitos, (cerca de 80 a 90% das células), melanócitos (em torno de 5%), células de Langerhans (3 a 8%) e células de Merkel. A epiderme da cobaia consiste em 2 a 3 camadas de queratinócitos com espessura variando entre 20 a 40  $\mu\text{m}$ , bastante similar estruturalmente embora menos espessa que a epiderme humana (75 a 150  $\mu\text{m}$ ). A epiderme e a derme também são separadas por uma membrana basal (GREVE; ANDERSON; NIELSEN, 2008). Em áreas de pele glabra submetidas a sobrecarga mecânica, como coxins plantares e plano nasal, a junção dermoepidérmica é irregular em virtude de projeções epidérmicas que se interdigitam com as papilas dérmicas, fortalecendo tal junção. Em áreas hirsutas, a junção dermoepidérmica é plana, com os folículos pilosos exercendo a função de ancoragem, similar à humana (GREVE; ANDERSEN; NIELSEN, 2008; STARCHER B, AYCOCK RL, HILL CH, 2005; TARNOWSKI *et al.*, 2003; TSUNODA *et al.* 2001).

Da mesma forma que em humanos, as fibras colágenas são o principal componente da derme murina, respondendo por 80% a 90% do peso seco da matriz extracelular (UITTO, 2008). Por outro lado, a elastina, componente central das fibras elásticas do tecido conjuntivo, correspondem a 2 a 4% do peso seco da derme (STARCHER, AYCOCK, HILL, 2005). A espessura da derme varia entre 1 e 2 mm. Em áreas com pelo mais grosso a derme é responsável pela maior parte da espessura da pele, ao passo que a epiderme é fina; nas áreas glabras, o inverso acontece (FERRY; ARGENTIERI; LOCHNER, 1995). A maioria das alterações morfohistológicas decorrentes de queimaduras repercutem diretamente na epiderme e derme, alterando a forma de deposição e organização do colágeno, além de outras propriedades estruturais (HERNDON, 2012).

Alguns antimicrobianos, como os macrolídeos, possuem ação anti-inflamatória intrínseca. Neste estudo optou-se pela não utilização de antibióticos. Apesar deste fato não ocorreu nenhum caso de infecção ou supuração, talvez pela rusticidade e resistência orgânica do animal.

O modelo mostrou-se plenamente adequado e efetivo no que diz respeito à anestesia com cetamina e xilazina por via IP, técnica amplamente utilizada em experimentação. Os animais atingiram rapidamente plano anestésico (cerca de 5 minutos), mantendo-o no decorrer da indução das queimaduras e recuperando-se

rapidamente (aproximadamente 10 minutos após o término). Não ocorreu óbito atribuível ao procedimento.

Quanto à analgesia pós-operatória, o estudo piloto previamente realizado mostrou que esta não era indispensável, já que os animais testados retornavam rapidamente a alimentar-se, sem redução da mobilidade, sinais indicativos da ausência ou de pouca estimulação dolorosa

### 6.3 Do modelo de queimadura

Apesar de alguns modelos de queimaduras empregarem a região ventral para realização das mesmas, a maioria dos estudos preferem a região dorsal do animal. A área de superfície corpórea (ASC) de animais de laboratório é calculada de acordo com a fórmula de Meeh:  $ASC = k \times W^{2/3}$ , sendo  $k$  a constante para cada espécie ( $k=9,46$  pro camundong) e  $W$  o peso do animal em grama. No caso do camundongo, apesar de seu pequeno porte, a escolha do dorso permite a escolha de uma região que, embora limitada, é adequada a indução de queimaduras <20% da ASC, dificultando o acesso da área às patas e rostro do animal. Além disso, os animais permaneceram em gaiolas isoladas após os procedimentos, o que impediu o canibalismo.

A área destinada à queimadura foi delimitada utilizando-se tricotomizador elétrico, imediatamente antes da mesma, de forma a minimizar a ocorrência de lesões de pele que poderiam ser causadas por lâminas de barbear ou assemelhados. Para assepsia foi utilizada a solução de clorexidina degermante e alcoólica (tópica), que é capaz de eliminar de 90 a 95% da flora residente [5555]. De forma similar a uma cirurgia convencional, a área a ser queimada foi guarnecida com campos cirúrgicos estéreis.

A realização das duas queimaduras na região medio-sagital dorsal também teve como objetivo evitar possível efeito da lateralidade na cicatrização, já que camundongos são destros ou canhotos, assim como minimizar o efeito do maior uso dos membros torácicos em detrimento dos pélvicos pelo animal com movimentação restrita em gaiolas (MESQUITA, 2008; MESQUITA *et al*, 2010).

#### 6.4 Dos tempos de observação

O aparecimento da contratura ou fibrose em humanos vítimas de queimaduras pode ocorrer precocemente, no médio ou longo prazo. Os primeiros indícios surgem por volta de três meses podendo ocorrer até vários anos depois.

Grabovoi (1999) avaliou os efeitos do propranolol e noradrenalina em diferentes concentrações sobre o neuroma de regeneração em neurotomia do ciático de ratos. Os momentos de observação foram 7, 14 e 28 dias. Os ratos tratados com propranolol injetado localmente (diluição de 1g/L) exibiram menor infiltrado inflamatório, menor densidade de fibroblastos e um maior comprimento das fibras nervosas no neuroma de regeneração já a partir do 7º dia.

Seguindo a hipótese de Coleman et al. (1993), pode-se traçar um paralelo entre a reação humoral e tissular em torno de um implante com o processo de reparo tissular. A resposta imediata ao trauma caracteriza-se pela hemostasia e inflamação. O colágeno exposto ativa a cascata de coagulação iniciando a fase inflamatória. Após a lesão, as membranas celulares liberam tromboxano A2 e PG-2-alfa que são vasoconstrictores potentes. O trombo formado por colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina serve como suporte a células inflamatórias (neutrófilos, monócitos) além de liberarem citocina e fatores quimiotáticos e de crescimento (PDGF, TGF beta, ILGF e VEGF, dentre outros) que causam congestão vascular e edema com um infiltrado inflamatório que dura em torno de cinco dias (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Nesta fase as células inflamatórias ativadas exibem alta taxa de consumo de oxigênio que associada ao impedimento da microcirculação resulta em hipóxia produzindo um aumento do lactato tanto pela via aeróbia quanto anaeróbica (SILVER, 1984; NIINIKOSKI; JUSSILA; VIHERSAARI, 1973; JENSEN *et al.*, 1986). A fase proliferativa inicia-se por volta do 4º dia concomitante à atenuação da fase inflamatória, sendo caracterizada pela epitelialização (se a pele for lesionada), neoformação vascular (angiogênese), proliferação fibroblástica e formação do tecido de granulação que estende-se até por volta do 14º dia. A angiogênese, que intenta restabelecer a microcirculação, envolve a movimentação dos endoteliócitos em resposta ao TNF-alfa e a três sucessivas ondas de fatores de crescimento. O colágeno do tecido de granulação (rico em colágeno tipo III) presente no reparo dérmico é bioquimicamente diferente do colágeno em tecido não lesionado. Depois da segunda semana ocorre a

desvascularização do tecido de granulação, a maturação e remodelação do colágeno, de duração em torno de dois anos (UENO; HUNT; HOPF, 2006).

Na literatura revisada acerca de fibrose pós-queimadura foram encontrados estudos com diversas espécies animais e com períodos de observação variando desde 3 dias até 9 meses. Deste modo, considerou-se que ainda não existe um desenho experimental ou protocolo ideal para tal estudo.

Os tempos de avaliação da dimensão fractal, lacunaridade e organização do colágeno seguiram os delineados de acordo com os objetivos do estudo original de Muniz (2009), que buscou avaliar a fibrose em queimaduras a curto/médio prazo, sem buscar uma cicatriz hipertrófica ou quelóide que inexistem em condições normais de experimentação animal, optando pelos períodos de observação de quatro, sete, quatorze e vinte e um dias. A vida média de um camundongo é de cerca de 1-2 anos enquanto a de humanos gira em torno de 75 anos. Um mês na vida do camundongo corresponde a cerca de 3 anos de vida do ser humano, o que faz com que 21 dias no presente estudo representem algo em torno de 2,1 anos. Mesmo levando-se em consideração as especificidades do envelhecimento de cada espécie, este estudo pode ser considerado como de médio prazo.

## 6.5 Da avaliação histológica

O processo reparativo de queimaduras, no nível microscópico, é avaliado tradicionalmente mediante técnicas de coloração como hematoxilina-eosina (HE), tricrômicos (Mallory, Masson) ou imunoquímicas como a picrossirius-polarização. Pela HE podem ser analisados diversos marcadores de inflamação, degradação e reparação tais como: exsudato neutrofílico, edema intersticial, necrose tissular, deposição de fibrina, neo-angiogênese, fibroplasia e fibrose. Os tricrômicos servem bem para análise do tecido conjuntivo, porém com o tempo as seções histológicas coradas por tais técnicas esmaecem, não permitindo a reavaliação a longo prazo. A técnica do vermelho de picrossirius ou *picrossirius red* (PSR) foi proposta inicialmente por Sweat e colaboradores em 1964 para o estudo das fibras colágenas, sendo posteriormente difundida por Bignolas e Kunqueira [1978] e solidificada por Junqueira e colaboradores [1982]. Nesta técnica, o corante *Sirius Red* F3AB acidificado pelo ácido pícrico reage com o colágeno e acola-se às suas fibrilas, aumentando a sua birrefringência normal. Quando examinado sob filtros

polarizadores o colágeno tipo I se expressa como fibras espessas e fortemente birrefringentes na coloração amarela ou vermelha, enquanto o colágeno tipo III aparece como fibras mais finas, fracamente birrefringentes e de coloração esverdeada (JUNQUEIRA, MONTES, SANCHES, 1982). De acordo com Noorlander e colaboradores (2002) a picrosirius polarização é o método mais apropriado para visualizar e individualizar as fibras colágenas, separando-as de outras estruturas eventualmente presentes na pele, como músculos e glândulas. O colágeno destaca-se sobre o fundo escuro, permitindo não somente à análise qualitativa da orientação das fibras colágenas mas, também, uma análise quantitativa em imagens digitais destas mesmas fibras. Este padrão permite o estudo experimental do colágeno global ou destes dois tipos de colágeno em separado, nas diversas fases de cicatrização por técnicas manuais ou com o auxílio de métodos computacionais como aqui realizado.

Nas amostras coradas pelo PSR, a análise sob luz polarizada mostrou que o colágeno tipo I (maduro), encontrava-se agrupado em grossos feixes entrelaçados e homogêneos, se correlacionando negativamente com processo fibrótico inativo, exibindo uma coloração avermelhada, enquanto o colágeno tipo III (imaturo, em fase de cicatrização), expressava-se com fibras finas e desorganizadas, assumindo uma coloração esverdeada ou amarelo-esverdeada. O aumento da birrefringência é exclusivo do colágeno. Outros estudos demonstraram que o método é barato, eficaz, sensível, específico e de fácil reprodutibilidade na identificação e quantificação do colágeno em tecidos normais e também em condições patológicas (MONTES *et al.*, 1985; MONTES; JUNQUEIRA, 1991; MAUAD *et al.*, 1996; LEMOS *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2003; MESQUITA, 2008; MESQUITA, 2010).

## **6.6 Da dimensão fractal do colágeno**

Os métodos de análise quantitativa baseados na Geometria Fractal, descritos por Benoit Mandelbrot nos anos setenta do século passado, tem suplementado os métodos quantitativos padrões, baseados na Geometria Euclidiana, descrita há mais de 2400 anos por Euclides de Alexandria (VICO *et al.*, 1994; KEDZIA *et al.*, 2002; Mesquita, 2014).

A análise fractal tem se mostrado útil e mais validada na quantificação de estruturas difíceis (ou impossíveis) de serem mensuradas pela metodologia tradicional (AVAKIAN *et al.*, 2002). Sua principal vantagem reside em fornecer uma medida única, a dimensão fractal ( $D$ ), para quantificar uma estrutura complexa. A dimensão fractal permite a descrição e a mensuração da autossimilaridade do objeto analisado: possibilita a comparação de partes da estrutura com a estrutura como um todo. *Grosso modo*, valores elevados de  $D$  correspondem a uma maior complexidade da estrutura analisada.

Lopes e Betrouni (2009) revisaram o conceito de análise fractal e multifractal. Afirmam que, apesar do uso disseminado da geometria fractal na análise de imagens nos mais diversos campos e, em especial no área médica, ela é aplicada de diferentes formas como resultados diversos.

A interpretação de uma imagem médica, seja ela radiológica ou histopatológica requer um análise constituída de vários passos, com o objetivo de detectar potenciais anormalidades. Para tanto é necessário reconhecer padrões característicos naquela imagem e, também, identificar as relações entre os padrões percebidos e os diagnósticos prováveis. Evidentemente o sucesso de tal empreitada depende fundamentalmente da habilidade e experiência técnica do examinador. Um dos achados mais usados neste processo é a textura, que contém informação acerca da profundidade cênica e orientação da superfície, servindo para descrever o conteúdo de imagens naturais ou artificiais (TOURASSI, 1999; LOPES; BETROUNI, 2009).

A autossimilaridade é uma característica que seria dificilmente verificada em imagens biológicas com resolução limitada. Na verdade, tais imagens possuem complexidade espacial e espectral, mas exibem similaridade em diferentes escalas espaciais. Assim, imagens com padrões espacialmente complexos poderiam ser descritos usando padrões simples da textura que a compõem. O principal atrativo da geometria fractal é justamente sua capacidade de descrever as formas irregulares, rugosas, complexas e fragmentadas dos objetos naturais ou artificiais que a geometria tradicional ou Euclideana falha em analisar. O fenômeno é expresso através de leis de escala estatisticamente estabelecidas no domínio espacial ou temporal, sendo caracterizado por leis de potencia presentes no mundo físico real (MANDELBROT, 1982; LOPES; BETROUNI, 2009).

Em virtude de tais características, a dimensão fractal tem sido usada para quantificar estruturas biológicas complexas como vasos retinianos (MAINSTER, 1990), tecido ósseo (FAZZALARI; PARKINSON, 1996), na discriminação entre tecido mamário normal e neoplásico em mamografias (CALDWELL *et al.*, 1990), na classificação da osteoporose em radiografias (CALIGIURI *et al.*, 1994), dentre outras aplicações.

Na presente pesquisa, a análise fractal foi utilizada na avaliação do processo de reparo em queimaduras de espessura parcial através da quantificação da dimensão fractal e lacunaridade do colágeno. Buscou-se identificar, por intermédio de um programa analisador de imagem, a microarquitetura da rede de fibras colágenas depositadas no leito da pele lesionada durante a cicatrização em diversos períodos de tempo correspondentes às fases de inflamação - exsudação (até 4 dias), fase proliferativa-regenerativa (do 4º dia até duas semanas após a injúria) e fase de remodelação (da segunda à 3ª semana) (CLARK, 2005). Assim, justifica-se os tempos para a coleta de amostras teciduais empregados neste trabalho, nomeadamente o 4º, 7º, 14º e 21º dias pós-queimadura (D4PQ, D7PQ, D21PQ e D21PQ).

Neste trabalho a Dimensão Fractal foi capaz de diferenciar efetivamente queimaduras tratadas com salina ou bleomicina da pele intacta. Os valores da DF do Col-G tanto do grupo salina quanto do bleomicina foi menor do que a DF da pele intacta em todos os momentos. Não houve diferença entre SAL e BLEO apenas no D4. Os valores da DF do Col-G no grupo BLEO aproximam-se dos do CTRL, sendo também maiores que os do grupo SAL em todos os momentos exceto em D4. Leite Filho (2015) utilizou o mesmo modelo de queimaduras tratando-as com salina ou imiquimode estudando as variações da DF do colágeno global. Encontrou que valores médios da DF diminuíram entre D4 e D7 pós-queimadura, mantendo-se valores similares em D14 e D21.

Aqui foi feita análise da Df do Col-G e dos tipos I e III individualmente. Ocorreu diferença significativa da DF do Col-1 intergrupos SAL e BLEO apenas em d21. Ocorreram diferenças significativas da DF do Col-3 intergrupos SAL e BLEO em todos os momentos, demonstrando que as alterações neste tipo de colágeno contribuíram mais do que as do Col-1 para as alterações estruturais do colágeno.

Neste trabalho foi acrescentado o estudo da lacunaridade do colágeno global da pele e seu principais subtipos (I e III). A lacunaridade do Col-G foi

significativamente maior no grupo SAL no D7, Col-1 e Col-3 foi maior durante a fase proliferativa e, também, ao final do processo cicatricial no grupo bleomicina, demonstrando uma ação dual desta substância na modulação da proliferação e remodelação do colágeno. O efeito modulador da bleomicina aplicada em dose única (D0) foi capaz de exercer ação efetiva no sentido de alterar a DF do colágeno depositado, sendo esta ação mais marcante no colágeno tipo III. Como esperado, a pele queimada não retornou à normalidade.

Leite Filho (2015), utilizando a metodologia proposta por Noorlander *et al.* (2002) para avaliação quantitativa da orientação dos feixes de fibras colágenas coradas pelo vermelho de picrossirius em queimaduras de espessura parcial em ratos tratados com salina ou imiquimode encontrou maior angulação na orientação das fibras tratadas com salina em todos os momentos pós-queimadura, exceto no D14.

No presente estudo a avaliação quantitativa da orientação dos feixes de fibras colágenas em queimaduras coradas pelo vermelho de picrossirius foi obtida por meio da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A orientação das fibras colágenas, mensurada FFT apresentou valores mais próximos da pele intacta no grupo tratado com salina. A angulação do colágeno foi maior na pele intacta do que nas queimaduras, independente do tratamento. A bleomicina foi capaz de modificar a orientação do colágeno no D4 e D21, ratificando a ação dual da bleomicina na fase inicial e final do processo reparativo.

A orientação dos feixes de colágeno também foi quantificada pela análise de Fourier por de Vries *et al.* (2000) e Van Zuijlen *et al.* (2002a,b). Estes autores validaram o método, mostrando também que a FFT pode ser usada de forma reprodutível com este objetivo. A análise de Fourier além de ter sido aplicada para determinar de forma objetiva a orientação do colágeno em doenças da pele e em cicatrizes cutâneas (van Zuijlen *et al.*, 2002a,b; Har-Shai *et al.*, 2003; van Zuijlen *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2005; Har-Shai *et al.*, 2006; Singer & McClain., 2006,) também tem sido amplamente utilizada para quantificar a orientação de estruturas em outros tecidos como ligamentos (Chaudhuri *et al.*, 1987), *annulus fibrosus* (Guerin: Elliott, 2006) e células do endotélio vascular (PALMER; BIZIOS, 1997)

Retornando à hipótese de Coleman e colaboradores (1993) que pressupõem uma “homeostase implante-hospedeiro”. Os autores evocam conceitos derivados da física (Lei da Ação e Reação, embora não se aprofundem no tema) e do Princípio de Homeostase de Walter Cannon (1871-1945) que, por sua vez,

reverberava o conceito oitocentista de preservação do *Millieu Interne* de Claude Bernard (1813-1878).

Para Cannon, qualquer variável fisiológica deveria retornar por meio de um *feedback* negativo ao seu estado estável (*steady-state*) “normal” após ser perturbado. Evolutivamente o organismo reagiria a todas as mudanças ambientais com uma resposta equilibrante de igual intensidade. O fisiologista L.J. Henderson, contemporâneo de Cannon na Universidade de Harvard, desenvolveu uma perspectiva diametralmente oposta: para Henderson a organização dos sistemas fisiológicos e de seus mecanismos subjacentes não são mutuamente exclusivos, mas sim interdependentes (WEST, 2012). Esta (nova) visão da Fisiologia leva em conta o desenvolvimento da Teoria Geral dos Sistemas de Bertalanffy e da Cibernética de Wiener. Discuti-las vai além do escopo desta tese.

Na atualidade, em particular nos meios mais eruditos da pesquisa biomédica que levam em conta conceitos derivados do estudo de modelos de dinâmica não linear como Teoria do Caos e Geometria Fractal, se fala em Homeodinâmica, em oposição a homeostase (WEST, 2012). Clínicos ao auscultar um coração, radiologistas e fisiologistas investigando o fluxo biliar ou o sistema nervoso estão, as vezes inadvertidamente explorando as fronteiras do Caos e dos fractais. Enquanto a homeostase é grandemente restritiva, a homeodinâmica requer a existência de múltiplos estados meta-estáveis para qualquer parâmetro fisiológico. Assim, a homeodinâmica encara um organismo humano saudável como sendo um sistema de alta complexidade e com uma variabilidade intrínseca: uma transição para uma configuração mais ordenada ou menos complicada pode ser indicativo de doença. Citando o exemplo de West, “(...) a saudável variabilidade [rítmica] do coração normal de mamíferos é perdida quando o indivíduo é acometido por insuficiência cardíaca, um estado no qual o espectro normal da pulsação do coração estreita dramaticamente”.

Na ciência medica moderna a variabilidade dos sistemas biológicos, em vez do *steady-state*, é muito mais levado em conta: o registro de ondas cerebrais ou do ritmo cardíaco, que exibem padrões aparentemente aleatórios e imprevisíveis, são muito mais similares a fenômenos naturais, como por exemplo, o comportamento não linear das marés ou o quebrar de uma onda no mar (WEST, 2012).

Uma das propriedades da linearidade é a proporcionalidade: a resposta à ação de cada fator distinto é proporcional ao seu valor. Assim, num balanço de brinquedo perfeitamente azeitado, a altura que este atinge seria diretamente proporcional à força com que é empurrado (desde que o balanço não ultrapasse a barra à qual está preso e que as correntes que o prendem não se entrelacem no seu retorno quando uma força muito grande seja empregada). A força excessiva destruiria a linearidade. Analogamente, a cápsula fibrosa ao redor de um implante estático como a prótese de silicone, que é no entanto, não rígido e até certo ponto compressível, não exibe uma resposta proporcional. Os estudos de segmento de longo prazo mostram que a contratura capsular adversa sempre tende a piorar ao longo do tempo quando não devidamente tratada (em vez de estabilizar). A radioterapia sobre mamas com implantes desorganiza a estrutura glandular e, em vez de melhorar ou diminuir a CCA a faz tornar-se mais evidente, independente da tensão intrainplante.

Outra propriedade de um sistema linear é a independência: a resposta total do sistema é igual à soma das forças resultantes de fatores distintos. No exemplo de West (2012) ao empurrar um carro com a bateria arriada em uma superfície plana, quanto mais pessoas o empurrarem maior será a velocidade imediatamente antes de se soltar a embreagem (desde que quem esteja na direção entenda como um freio, a embreagem e um câmbio manual funcionem). Matematicamente falando, um sistema é linear se o output é diretamente proporcional ao input. O contrário é verdade num sistema não linear, como o corpo humano. A resposta total de um sistema é igual à soma dos resultados de valores de fatores distintos.

## **6.7 Considerações finais**

O desejo primordial de representar o mundo em imagens vem de longa data. Descobertas arqueológicas sugerem que neandertalenses e os primeiros *Homo Sapiens* usaram cavernas e túneis enfeitados de estalagmites e estalactites para abrigo e cerimônias por dezenas de milhares de anos. No início dos anos 1990 mais de quinhentas antigas pinturas de bisões, cavalos, leões, panteras, ursos, mamutes, aves, peixes, marcas da mão de uma criança e diversas representações pictóricas do corpo e do sexo de mulheres foram descobertas no complexo de

cavernas de Arcy-sur-Cure e Chauvet, na França. A datação radiométrica determinou que as imagens tinham 30.000 anos ou mais. Igor Reznikof (2005), etnomusicólogo da Universidade de Paris, verificou que as imagens, na maioria das vezes, estavam localizadas em áreas das cavernas onde a reverberação era mais profunda e onde foram encontrados restos de fogueira e instrumentos paleolíticos, o que rapidamente foi associado a rituais xamânicos em torno do fogo, com a acústica peculiar das cavernas amplificando e reforçando os sons inebriantes da voz humana. Antropólogos, espeleólogos e arqueólogos concordam ao dizer que tais pinturas rupestres não são fatos aleatórios, mas sim, uma forma de arte, resultante da combinação dos efeitos de reconhecimento de padrões, do uso de uma câmara escura natural e da abstração visual.

O reconhecimento de padrões (visuais, acústicos, táteis, gustativos e olfativos) além de inato à espécie humana parece ser essencial à sua sobrevivência ao longo da história e, talvez, ao lento processo civilizador, no qual todo indivíduo sofre influência e é modelado pelo comportamento do outro (ELIAS, 1994). Apesar do homem ser, nas palavras de Richard Dawkins (2007), uma máquina de sobrevivência, o homem não é rápido e nem suficientemente forte. As pessoas são desprovidas de asas, garras, presas, carapaças e veneno. Assim, o ser humano foi programado pela seleção natural a detectar padrões e reagir a ameaças e oportunidades sem demasiada hesitação. Nas primeiras eras de sua existência o ser humano observou o céu estrelado, identificando astros, abstraíndo formas e registrando agrupamento de estrelas que lhe facilitaram o deslocamento marítimo e terrestre (SAGAN, 1996).

O registro de mapas físicos e/ou mentais favoreceu a busca de climas mais amenos onde pudesse estabelecer o seu clã, identificando por meio de erros e acertos espécies animais e vegetais domesticáveis e comestíveis. A observação da periodicidade das marés e dos ciclos lunares e solares, por sua vez, permitiu o reconhecimento das estações, facilitando-lhe a pesca e o cultivo e também a mudança do hábito de coletador-caçador para criador-agricultor. Etnólogos e antropólogos afirmam que domínio de técnicas de preservação da carne através do salgamento e do fogo para cozer e assar alimentos foi um passo fundamental na história da humanidade. Reconhecer padrões permite que se façam hipóteses, análises e previsões. O filósofo Karl Popper (1902-1994), citado por Oliveira (2012), afirmou que "...O conhecimento científico e a racionalidade humana que o produz,

são em meu entender, sempre falíveis ou sujeitos a erro”. Popper introduziu o conceito de falseabilidade, no sentido de que uma hipótese só pode ser considerada científica se puder ser falsificável, ou seja, testada no mundo real por meio de uma previsão ou conjectura [2007]. Teorias devem ser apresentadas como conjecturas ousadas e serem submetidas a testes rigorosos com o intuito de falseá-las ou, eventualmente corroborá-las, fazendo uso de uma atitude crítica na busca da verdade (OLIVEIRA, 2012). No mundo atual, nossos instintos biológicos, enganosamente, parecem estar atenuados.

Popper afirmou que:

Poderemos, se quisermos, distinguir quatro diferentes linhas ao longo das quais se pode submeter a prova uma teoria. Há, em primeiro lugar, a comparação lógica das conclusões umas às outras, com o que se põe à prova a coerência interna do sistema. Há, em segundo lugar, a investigação da forma lógica da teoria, com o objetivo de determinar se ela apresenta o caráter de uma teoria empírica ou científica, ou se é, por exemplo, tautológica. Em terceiro lugar, vem a comparação com outras teorias, com o objetivo sobretudo de determinar se a teoria representará um avanço de ordem científica, no caso de passar satisfatoriamente as várias provas. Finalmente, há a comprovação da teoria por meio de aplicações empíricas das conclusões que dela se possam deduzir [(1935); 1972; 2007].

O presente trabalho foi norteado, na medida do possível, nestes princípios. Em primeiro lugar, uma hipótese foi levantada: uma queimadura pode ser analisada pela geometria fractal? Para tanto fez-se necessário a comparação entre imagens histológicas de fragmentos de pele intacta e pele queimada, rejeitando a hipótese nula: possuem dimensão fractal, lacunaridade e organização diferentes. Em segundo lugar, o teste da hipótese foi feito empiricamente através de um método objetivo: embora não tenha sido possível o “mascaramento” do observador, foram empregados um grupo controle negativo (pele não submetida a queimadura), um grupo controle positivo (grupo queimado tratado com placebo) e um terceiro grupo para verificar a eficácia ou ineficácia de uma intervenção terapêutica (grupo bleomicina), sendo que no estudo do qual foi obtido o banco de imagens os animais foram randomicamente selecionados, fatos estes que, aliados ao emprego de métodos estatísticos robustos e à análise computadorizada das imagens utilizando-se de algoritmos previamente determinados e rigorosamente seguidos, se buscou minimizar a interferência da subjetividade do examinador nos resultados pelo s. Em terceiro lugar, o fato do estudo ser inédito não foi capaz de impedir a comparação

com estudos assemelhados que também empregaram o conceito de fractais na área médica, permitindo, na opinião do pesquisador, um avanço na compreensão do processo de reparo. Finalmente, comprovou-se, pela aplicação empírica (avaliação do teste terapêutico pela análise da dimensão fractal, da lacunaridade e da organização do colágeno, com a bleomicina mostrando-se eficaz em reduzir o índice de fibrose nas queimaduras nos períodos de reparo iniciais e ao final do estudo.

Pesquisas futuras, realizadas prospectivamente, utilizando um modelo suíno de queimadura, cuja pele guarde mais similaridades com a pele humana, com a adjuvância de técnicas avançadas como a laser-doppler-fluxometria, microscopia confocal e eletrônica, são recomendadas e seriam bem-vindas no sentido de proporcionar maior aplicabilidade da geometria fractal e histomorfometria microestrutural não só em pesquisa básica, mas, também, na prática clínica e manejo de queimaduras.

A aplicabilidade prática deste estudo, numa abordagem translacional, poderia relacionar-se à extensão dos resultados de bancada à prática clínica. Pode-se exemplificar três situações em que pacientes queimados poderiam se beneficiar do conhecimento médico aprofundado do tema: 1) acompanhamento da evolução da queimadura em pacientes submetidos a escarotomias por meio de estudo da DF e lacunaridade do colágeno do tecido excisado; 2) verificação da viabilidade de enxertos ou retalhos por meio da análise fractal e da FFT em biópsias contendo a interface enxerto/retalho-área receptora e 3) análise da ação de terapêuticas regenerativas com cultura de células produzidas a partir de células maduras e/ou células tronco autógenas, alógenas ou xenógenas por meio da análise da lacunaridade e FFT.

## 7 CONCLUSÃO

A dimensão fractal foi capaz de diferenciar efetivamente queimaduras tratadas com salina ou bleomicina daquelas da pele intacta. Os valores da DF no grupo bleomicina aproximavam-se dos valores encontrados na pele não queimada.

A lacunaridade do colágeno tipo III foi maior durante a fase proliferativa e ao final do processo cicatricial no grupo bleomicina, demonstrando uma ação dual e duradoura da substância.

A orientação das fibras colágenas apresentavam valores mais próximos da pele intacta no grupo tratado com salina. A bleomicina foi capaz de alterar significativamente tal orientação ao final do processo reparativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S.J.; DA COSTA, R.; DILLER, K.R.; HINICH, M.J. The effects of burn injury on vasoactivity in hamster peripheral microcirculation. **Microvasc Res.**, v.40 n.1, p.73-87, Jul. 1990.
- ALHADY, S.M.; SIVANANANTHRAJAH, K. Keloids in various races: a review of 175 cases. **Plast Reconstr Surg.** v.44, n.6, p.564-6, 1969.
- ALMEIDA, L.B. The fractional Fourier transform and time-frequency representations. **Antennas and Propagation Magazine**, v.42, p.3084-3091, 1994.
- AMERICAN BURN ASSOCIATION, National Burn Repository, 2005 Report. Disponível em <http://www.ameriburn.org/NBR2005.pdf>, 2006. Acesso: em 12 Jan. 2016.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório**: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- ASSIS, T.A.; MIRANDA, J.G.V.; MOTA, F.B.; ANDRADE, R.F.S.; CASTILHO, C.M.C. **Geometria fractal**: propriedades e características de fractais ideais. **Rev Bras Ensino Fís.**, v.30, n.2, p.2304-10, 2008. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-11172008000200005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-11172008000200005&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 13 Jan. 2015.
- BACKES, A. R. **Implementação e comparação de métodos de estimativa da dimensão fractal e sua aplicação análise e processamento de imagens**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- BAHAR, T.; BILEZIKCI, B.; MARAL, T.; BORMAN, H. A modified partial-thickness burn model in rats. **Burns**, v.33, p.S52-S3, 2007.
- BARRIENTOS, S. *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, n.5, p.585-601, 2008.
- BARRON, J.N. Essai de prévention des cicatrices chéloïdiennes par l'emploi des rayons bêta. **Ann Chir Plast**, v.32, p. 29, 1956.
- BERNZ, L.M.; MIGNONI, I.S.P.; PEREIMA, M.J.L.; SOUZA, J.A.; ARAÚJO, E.J.; FEIJÓ, R. Análise das causas de óbito de crianças queimadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão, no período de 1991 a 2008. **Rev Bras Queimaduras**, v.8, n.1, p.9-13, 2009.
- BHATTACHARYA, S. What is new in burn care? **Indian J Plast Surg**, v. 43 (Suppl):S1-2, Sep. 2010.
- BODOKH, I.; BRUN, P. Traitement des chéloïdes par infiltrations de bléomycine. **Ann Dermatol Venereol**, v.123, p.791-4, 1996.
- CALVIN, M.; DYSON, M.; RYMER, J.; YOUNG, S.R. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. **Br J Obstet Gynaecol**, v.105, n.2, p.223-7, 1998.

CAMPBELL, R.D. Describing the shapes of fern leaves: A fractal geometrical approach. **Acta Biotheoretica**, v.44, p.119-142, 1996.

CANTARELLI, K.J.; MARTINS, C.L.; ANTONIOLLI, L.; SCHIAVON, V.C.; MORAES, L.P.; PAI, D.D. *et al.* Prevenção de queimaduras em ambiente escolar: relato de experiência. **Rev Bras Queimaduras**, v.12, n.3, p.165-168, 2013.

CASTAGNOLI, C.; STELLA, M.; MAGLIACANI, G.; TEICH ALASIA, S.; RICHIARDI, P. Anomalous expression of HLA class II molecules on keratinocytes and fibroblasts in hypertrophic scars consequent to thermal injury. **Clin Exp Immunol**, v.82, n.2, p.350-354, 1990.

CHAUDHURI, S.; NGUYEN, H.; RANGAYYAN, R.M.; WALSH, S.; FRANK, C.B. A Fourier domain directional filtering method for analysis of collagen alignment in ligaments. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, v.34, p.509-518, 1987.

CHEN, K.; CHEN, J.; LI, D.; ZHANG, X.; MEHTA, J.L. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone. **Hypertension**, v.44, p.655-661, 2004.

CLARK, R.A. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2th ed. p4. New York, 1996.

COLEMAN, D.J.; SHARPE, D.T.; NAYLOR, I.L; CHANDER, C.L.; CROSS, S.E. The role of the contractile fibroblast in the capsules around tissue expanders and implants. **Br. J. Plast. Surg**, v.46, n.7, p.547, 1993.

COLUCCI, N.R.S. **Estudo histopatológico do efeito da infiltração de bleomicina no tratamento das cicatrizes hipertróficas e queloidianas**. 2000. (Tese) Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

CRACCO, C.; STELLA, M.; TEICH ALASIA, S.; FILOGAMO, G. Comparative study of Langerhans cells in normal and pathological human scars, II: hypertrophic scars. **Eur J Histochem**, v.36, n.1, p.53-65, 1992.

CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M.T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. **Wound Rep Reg**, v.13, n.2, p.198-204, 2005.

CUTTLE, L.; NATATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M.T. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. **Wound Rep Reg**, v.13, n.2, p.198-204, 2005.

DIOGUARDI, N. *et al.* Metrically measuring liver biopsy: A chronic hepatitis B and C computer-aided morphologic description. **World journal of gastroenterology: WJG**, v.14, n.48, p.7335, 2008.

DOMERG, S.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Advances in Research in Animal Models of Burn-Related Hypertrophic Scarring. **J Burn Care Res**, v.36, n.5, p.259-266, Set-Out. 2015.

FALCONER, K. **Fractal geometry: mathematical foundations and applications**. John Wiley & Sons, 2003. (Faltando a cidade da editora)

FERRY, L.L.; ARGENTIERI, G.; LOCHNER, D.H. The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.70, p.43-56, 1995.

FORJOUH, S. N.; Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention. **Burns**, v. 32, p.529-537, 2006.

FOSTER, H.; SMALL, D.; FOX, G. **The mouse in biomedical research**. New York: Academic Press, 1983. 272p.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.35, n.3, p.203-206, Mai./Jun. 2008.

GALLO, R.L. Proteoglycans and glycosaminoglycans of skin. *In*: FREDBERG, E.M. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in general medicine**. 5.ed. Cidade: McGraw-Hill, 1999. v.1, Cap.223, p.283-8.

GANGEMI, E.N.; GREGORI, D.; BERCHIALLA, P.; ZINGARELLI, E.; CAIRO, M.; BOLLERO, D.; GANEM, J.; CAPOCELLI, R.; CUCCURU, F.; CASSANO, P.; RISSO,

GOLD, M.H. A controled clinical trial of topical silicone gel sheeting in the treatment of hypertrophic scars and keloids. **J Am Acad Dermatol**, v.30, p.506-7, 1994.

GOLDBERGER, A.L.; RIGNEY, D.R.; WEST, B.J. Chaos and fractals in human physiology. **Sci.Am.**, v.262, p42-49,1990.

GRABOVOI, A.N. Effects of noradrenaline and propranolol on the regeneration neuroma of the rat sciatic nerve. **Neurophysiology**, v.31, n.1, p.83-86, 1999.

GREVE, T.M.; ANDERSEN, K.B.; NIELSEN, O.F. ATR-FTRI, FT-NIR and near-FT-Raman spectroscopic studies of molecular composition in human skin in vivo and pig ear skin in vitro. **Spectroscopy**, v.22, p.437-457, 2008.

GUERIN, H.A.; ELLIOTT, D.M. Degeneration affects the fiber reorientation of human annulus fibrosus under tensile load. **J. Biomech.**, v.39, p.1410-1418, 2006.

GULICK, D. Fractals. **Encounters with Chaos**. New York: McGraw-Hill, 1992, p.188-239.

HAR-SHAI, Y.; ARNAR, M; SABO, E. Intralesional cryotherapy for enhancing the involution of hypertrophic scars and keloids. **Plast. Reconstr. Surg**, v.111, p.1841-1852, 2003.

HAR-SHAI, Y.; SABO, E.; ROHDE, E.; HYAMS, M.; ASSAF, C.; ZOUBOULIS, C.C. Intralesional cryosurgery enhances the involution of recalcitrant auricular keloids: a new clinical approach supported by experimental studies. **Wound Repair Regen.**, v.14, p.18-27, 2006.

HASSELQUIST, M.B.; GOLDBERG, N.; SCHROETER, A.; SPELSBERG, T.C. Isolation and characterisation of the estrogen receptor in human skin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.50, n.1, p.76-82, 1980.

HENNING, J.P.H.; ROSKAM, Y.; VAN GEMERT, M.J.C. Treatment of keloids and hypertrophic scars with an argon laser. **Lasers in Surg. Med**, v.6, p.72-5, 1986.

HENRIQUES, F.C.; MORITZ, A.R. The conduction of heat to and through skin and the temperatures attained therein. A theoretical and an experimental investigation. **Am. J. Pathol.** v.23, p.530-549, Jul.1947.

HERNDON, D.N. Preface to the fourth edition of total burn care. *In*: \_\_\_\_\_. **Total burn care**. 4th ed., Saunders, China, p.6, 2012.

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. Pathophysiology and types of burns. **BMJ**, v.328, p.1427-1429, Jun. 2004.

HINZ, B.; PHAN, S.H.; THANNICKAL, V.J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M.L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: One function, multiple origins. **Am. J. Pathol**, v.170, p.1807, 2007.

I.C.V.G.A.N., International Comittee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, **Nomina Anatomica Veterinaria**, 5<sup>th</sup> edition, Hannover, Clumbia, Gent, Sapporo: Editorial Comittee, 2005. Disponível em: [http://www.wava-amav.org/Downloads/nav\\_2005.pdf](http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2005.pdf). Acesso em: 27 Abr. 2010.

Int J Low Extrem Wounds. v.7, n.3, p.176-81, Sep. 2008.

JANOS, M. **Geometria Fractal**. Rio de Janeiro: Ciência Moderna Ltda, 2008.

JESCHKE, M.G.; FINNERTY, C.C.; HERNDON, D.N.; SONG, J.; BOEHNING, D.; TOMPKINS, R.R. *et al.* Severe injury is associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress response, and unfolded protein response. **Ann Surg.**, v.255, n.2, p.370-8, 2012.

JONES, W.G. *et al.* Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis. **Annals of surgery**, v.211, n.4, p.399, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical journal**, v.11, n.4, p.447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v.41, n.3, p.267-274, 1978.

KAMAMOTO, F. **Contração de feridas: revisão bibliográfica e estudo da contração gerada por fibroblastos normais e de quelóides**. 2007

KLEIN, M.B.; SILVER, G.; GAMELLI, R.L. *et al.* Inflammation and the host response to injury: an overview of the multicenter study of the genomic and proteomic response to burn injury. **J Burn Care Res**, v.27, n.4, p.448-451, 2006.

LAGARDE, J.M.; ROUVRAIS, C.; BLACK, D. Topography and anisotropy of the skinsurface with ageing. **Skin Res Technol**, v.11, n.2, p.110-9, 2005.

LAPIÈRE, C.M. Collagenase and impaired wound healing. **J Invest Dermatol**, v.120,

LIMA JÚNIOR, E.M.; MELO, M.C.A.; ALVES, C.C.; ALVES, E.P.; PARENTE, E.A.; FERREIRA, G.E. *et al.* Avaliação do conhecimento e promoção da conscientização acerca da prevenção de queimaduras na população de Fortaleza - CE. **Rev Bras Queimaduras**, v.13, n.3, p.161-167, 2014.

LIMA JÚNIOR, E.M.L.; NOVAES, F.N.; PICCOLO, N.; SERRA, M.C.V.F. **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

MAJEROWICZ, J. Procedimentos de segurança envolvendo animais de laboratório. *In*: TEIXEIRA, P. **Curso de Aperfeiçoamento em Biossegurança**. Rio de Janeiro: EAD/ Ensp; 2000a. Cap.18, p.1-10.

MAJNO, G. **The healing hand: man and wound in the ancient world**. Harvard University Press, Cambridge, 1975.

MANDELBROT, B.B. **The fractal geometry of nature**. Macmillan, 1983. (Falta editora e Cidade da editor)

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, n.5309, p.75-81, Apr. 1997.

MELIS, P.; NOORLANDER, M.L.; VAN DER HORST; C.M.A.M; VAN NOORDEN, C.J.F. Rapid alignment of collagen fibers in the dermis of undermined and not undermined skin stretched with a skin-stretching device. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.109, p.674-681, 2002.

MELO, E.C.M; LEMOS, M., XIMENES FILHO, J.A.; SENNES, L.U.; SALDIVA, P.H.N.; TSUJI, D.H. Distribution of Collagen in the Lamina Propria of the Human Vocal Fold. **Laryngoscope**, v.113, p.2187-2191, 2003.

MESQUITA, C.J. About strawberry, crab claws, and the Sir James Black's invention. Hypothesis: can we battle keloids with propranolol? **Med Hypotheses**, v.74, n.2, p.353-9, Feb. 2010. Epub 2009 Sep 15.

MESQUITA, C.J. About strawberry, crab claws, and the Sir James Black's invention. Hypothesis: can we battle keloids with propranolol? **Med Hypotheses**. v.74, n.2, p.353-9, Feb. 2010.

MESQUITA, C.J.G. **Dimensão fractal e histometria digital na avaliação dos efeitos do propranolol sobre a reação capsular ao implante de silicone**. ed. Cidade: Editora, 2014.

MESQUITA, C.J.G. **Em Carne Viva: Estética da Feiura e Redefinições Corporais**. 1. ed. Fortaleza: LCR, 2012. 113p.

MESQUITA, C.J.G.; LEITE, J.A.D.; FECHINE, F.V.; ROCHA, J.L.C.; LEITE, J.G.S.; LEITE FILHO, J.A.D., BARBOSA FILHO, R.A. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns**, v.36, p.97-108, 2010.

MONAFO, W.W. Then and now: 50 years of burn treatment. **Burns**, v.18, p.S7-S10, 1992.

MONTES, S.F.; BARBOSA, M.H.; SOUSA NETO, A.L. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. **Rev Esc Enferm USP**, v.45, n.2, p.369-73, 2011.

MOREIRA, M.; FAGUNDES, D.J.; DE JESUS SIMÕES, M.; DE OLIVEIRA, M.C.; DOS SANTOS PREVIDELLI, I.T.; MOREIRA, A.C. Zafirlukast pocket delivery impairs the capsule healing around textured implants in rats. **Aesthetic Plast Surg**, v.33, n.1, p.90-7, 2009.

MORIN, T.M. **Práticas e representações das mulheres na Revolução Francesa – 1789-1795**. 2009, 224 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2009.

MUSTOE, T.A.; COOTER, R.D.; GOLD, M.H. *et al.* International clinical recommendations on scar management. **Plast Reconstr Surg**, v.110, n.2, p.560-571, 2002.

MUTI, E.; PONZIO, E. Cryotherapy in the treatment of keloids. **Ann Plast Surg**, v.3, p.227-32, 1983.

NG, C.P.; HINZ, B.; SWARTZ, M.A. Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro. **J. Cell. Sci.**, v.118, p.4731-4739, 2005.

NGUYEN, D.Q.A.; POTOKAR, T.S.; PRICE, P. An objective long-term evaluation of Integra (a dermal skin substitute) and split thickness skin grafts, in acute burns and reconstructive surgery. **Burns**, v.36, n.1, p.23-28, 2010.

NIESSEN, F.B.; SPAUWEN, P.H.; SCHALKWIJK, J.; KON, M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. **Plast Reconstr Surg**, v.104, n.5, p.1435-1458, 1999.

NIINIKOSKI, J.; JUSSILA, P.; VIHERSAARI, T. Radical mastectomy wound as a model for studies of human wound metabolism. **Am. J. Surg.**, v.126, p.53, 1973.

NOORLANDER, M.L. *et al.* A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.50, n.11, p.1469-1474, 2002.

OKAMOTO, Y.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M. Oral administration of a novel chymase inhibitor, NK3201, prevents peritoneal adhesion formation in hamsters. **Jpn J Pharmacol.**, v.90, n.1, p.94-6, Sep. 2002.

OTA, M.; KAWASHIMA, M.; MITSUISHI, T. Multiple Bowen's disease of the fingers. **Eur J Dermatol.**, v.12, p.275-7, 2002. [ [Links](#) ]

PADFIELD, K.E.; ZHANG, Q.; GOPALAN, S. *et al.* Local and distant burn injury alter immunoinflammatory gene expression in skeletal muscle. **J Trauma**, v.61, n.2, p.280-292, 2006.

PALMER, B.M.; BIZIOS, R. Quantitative characterization of vascular endothelial cell morphology and orientation using Fourier transform analysis. **J. Biomech. Eng.**, v.119, p.159-165, 1997.

PEACOCK, E.E.J.R. **Inflammation and cellular response to injury in wound healing**. 30.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1984.

PECK, M.; PRESSMAN, M.A. The correlation between burn mortality rates from fire and flame and economic status of countries. **Burns**, v.39, n.6, p.1054-9, 2013.

PHAM, C. *et al.* Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. **Burns**, v.33, n.8, p.946-957, 2007.

PROCKOP, D.J.; KIVIRIKKO, K.T.; TUDERMAN, L.; GUZMAN, N.A. The Biosynthesis of Collagen and Its Disorders. **N. Engl. J. Med.**, v.301, p.12-31, p77-85, Jul.1979.

RAINE, T.J.; HEGGERS, J. P.; ROBSON, M.C.; LONDON, M.D.; JOHNS, L. Cooling the burn wound to maintain microcirculation. **J Trauma**, v.21, p.394-397, Jun.1981.

RIBEIRO, J.F.; ANJOS, E.H.M.; MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis. **PLOSone**, (8):e54724, 2013.

ROCHA, J.L.C. **Efeitos da mitomicina-c tópica em queimadura de camudongo**. 2010.

RODAS-ESPINOZA, A.F.; ENRIQUEZ, M.J.; ALCALÁ, P.D.; PERALTA, P.M.L. Efectividad de la bleomicina intralesional para el tratamiento de pacientes con cicatrices queloides. Estudio comparativo con dexametasona. **Dermatol Rev Mex**, v.55, n.3, p.119-126, 2011.

SAARINEN, J.; KALKKINEN, N.; WELGUS, H.G.; KOVANEN, P.T. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. **J Biol Chem**, v.8, n.2, p.269, Jul. 1994.

SAKAGUCHI, M.; TAKAI, S.; JIN, D.; OKAMOTO, Y.; MURAMATSU, M.; KIM, S.; MIYAZAKI, M. A specific chymase inhibitor, NK3201, suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. **Eur J Pharmacol.**, v.16, n.493 (1-3), p.173-6, Jun. 2004.

SCHWARZE, H. *et al.* Suprathel, a new skin substitute, in the management of partial-thickness burn wounds: results of a clinical study. **Annals of plastic surgery**, v.60, n.2, p.181-185, 2008.

SHAN, M.G.; MAIBACH, H.I. Estrogen and skin: an overview. **Am J Clin Dermatol**, v.2, n.3, p.143-5, 2001.

SHAW, T.J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. **J Cell Sci**, v.15, n.122 (Pt 18), p.3209-13, Sep. 2009.

SHIOTA, N.; JIN, D.; TAKAI, S.; KAWAMURA, T.; KOYAMA, M.; NAKAMURA, N.; MIYAZAKI, M. Chymase is activated in the hamster heart following ventricular fibrosis during the chronic stage of hypertension. **FEBS Lett.**, v.14, n.406 (3), p.301-4, Apr. 1997.

- SILVER, I.A. Cellular microenvironment in healing and nonhealing wounds. *In*: HUNT, T.K.; HEPPENSTALL, R.B.; PINES, E. **Soft and Hard Tissue Repair**. New York: Praeger, 1984, p.50-66.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.**, v.2, n.341 (10), p.738-46, Sep.1999.
- SINGER, A.J.; McCLAIN, S.A. Development of a porcine incisional wound model and novel scarring scales. **Wound Repair Regen**, v.14, p.492-497, 2006.
- SMITH, T.G.; LANGE, G.D.; MARKS, W.B. Fractal methods and results in cellular morphology—dimensions, lacunarity and multifractals. **Journal of neuroscience methods**, v.69, n.2, p.123-136, 1996.
- STARCKER, B.; AYCOCK, R.L.; HILL, C.H. Multiple roles for elastic fibers in the skin. **J. of Histochemistry and Cytochemistry**, v.53, n.18, p.431-443, 2005.
- STELLA, M.; CASTAGNOLI, C.; GANGEMI, E.N. **Postburn scars**: an update, (falta restante dos dados)
- STELLA, M.; CASTAGNOLI, C.; TROMBOTTO, C.; CALCAGNI, M.; MAGLIACANI, G. Teich Alasia S. Interrelationship between immunocompetent and structural cells in post-burn scars. **Eur J Plast Surg.**, v.21, p.8-13, 1998.
- STIEFEL, M.; SHANER, A.; SCHAEFER, S.D. The Edwin Smith Papyrus: the birth of analytical thinking in medicine and otolaryngology. **Laryngoscope**, v.116, n.2, p.182-8, Feb. 2006.
- TAKABAYASHI, K. Age and gender difference in rheumatology. **Nippon Ronen Igakkai Zasshi**, v.42, n.6, p.639-641, 2005.
- TARNOWSKI, C.P.; STEWART, S.; HOLDER, K.; CAMPBELL-CLARK, L.; THOMA, R.J.; ADAMS, A.K.; MOORE, M.A.; MORRIS, M.D. Effects of treatment protocols and subcutaneous implantation on bovine pericardium: a Raman spectroscopy study. **J. Biomed. Opt.**, v.8, p.179-184, 2003.
- TENG, M.; HUANG, Y.; ZHANG, H. Application of stems cells in wound healing - an update. **Wound Repair and Regeneration**, v.22, n.2, p.151-160, 2014.
- TOMIMORI, Y.; MUTO, T.; SAITO, K.; TANAKA, T.; MARUOKA, H.; SUMIDA, M.; FUKAMI, H.; FUKUDA, Y. Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Eur J Pharmacol.**, v.8, n.478 (2-3), p.179-85, Oct. 2003.
- TREDGET, E.E. The basis of fibrosis and wound healing disorders following thermal injury. **J Trauma**. v.62, (6 Suppl), p.S69, Jun. 2007.
- TSUNODA, K.; SUGIURA, M.; SONOYAMA, M.; YAJIMA, H.; ISHII, T.; TANIYAMA, J.; ITOB, H. Characterization of water contribution to excimer laser ablation of collagen. **J. Photochem. Photobiol.**, v.145, p.195-200, 2001.
- TYACK, Z. *et al.* A systematic review of the quality of burn scar rating scales for clinical and research use. **Burns**, v.38, n.1, p.6-18, 2012.

UITTO, J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. **J. of Drugs in Dermatology**, v.7, p.x12-x16, 2008.

ÜLKÜR, E. *et al.* Comparison of silver-coated dressing (Acticoat™), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®), and fusidic acid 2% (Fucidin®) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. **Burns**, v.31, n.7, p.874-877, 2005.

VAN ZUIJLEN, P.P. *et al.* Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. **Burns**, v.29, p.423-431, 2003.

VAN ZUIJLEN, P.P.; DE VRIES, H.J.; LAMME, E.N.; COPPENS, J.E; VAN MARLE, J.; KREIS, R.W.; MIDDELKOOP, E. Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. **J. Pathol.**, v.198, p.284-291, 2002b.

VAN ZUIJLEN, P.P.; LAMME, E.N.; VAN GALEN, M.J.; VAN MARLE, J.; KREIS, R.W; MIDDELKOOP, E. Long-term results of a clinical trial on dermal substitution. A light microscopy and Fourier analysis based evaluation. **Burns**, v.28, p.151-160, 2002a.

van ZUIJLEN, P.P.M.; de VRIES, H.J.C.; LAMME, E. N.; COPPENS, J.E.; van Marle, J.; KREIS, R.W.; MIDDELKOOP, E.; Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. **J. Pathology.**, v.198, p.284-291, 2002.

VARTIO, T.; SEPPÄ, H.; VAHERI, A. Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. **J Biol Chem.**, v.10, n.256(1), p.471-7, Jan. 1981.

VASILESCU, C. *et al.* Differences between intestinal and diffuse gastric carcinoma: A fractal analysis. *In: \_\_\_\_\_*. **Proceedings of the Interdisciplinary Approach of Fractal Analysis Symposium (IAFA), Bucharest, Romania**, 2003, p.249-254.

VENTER, T.H.J.; KARPELOWSKY, J. S.; RODE, H. Cooling of the burn wound: the ideal temperature of the coolant. **Burns**, v.33, p.917-922, Nov. 2007.

VIDAL, B.C. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: Microphotometric measurements of textural birefringence. **Cell Mol Biol**, v.32, p.527-535, 1986.

WERNER, D.H.; HAUPT, R.L.; WERNER, P.L. Fractal antenna engineering: the theory and design of fractal antenna arrays. **Antennas and Propagation Magazine**, v.41, p.37-38, 1999.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol.**, v.214, n.2, p.199-210, Jan. 2008.

XU, R.X. *et al.* **Burns regenerative medicine and therapy**. Karger, Basel, Switzerland, 2004.

ZAWACKI, B. E. Reversal of capillary stasis and prevention of necrosis in burns. **Ann. Surg.** v.180, p.98-102, Jul., 1974.