

nt
EDUARDO DIAS DE ANDRADE

ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOFOTOMÉTRICO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO DE RATOS EM CONDIÇÕES NORMAIS E SOB AÇÃO DE DROGAS ANTIINFLAMATÓRIAS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia (Farmacologia Aplicada à Clínica Odontológica).

PIRACICABA

1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, que através de exemplos
de caráter e retidão, me proporcion
aram mais esta oportunidade,

... à minha esposa Maria Isabel,
pelo incentivo, despreendimento e amor,
transmitidos a todo o momento,

... aos meus filhos, Cassio e Rafael,
pela paz espiritual emanada,

... ofereço este trabalho.

... ao Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli,
cuja orientação segura e efetiva deste traba
balho, muito contribuiu para a minha formaç
ção científica,

... o meu respeito e reconhecimento.

... ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder,
DD. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piraci
caba - Universidade Estadual de Campinas, pelas
oportunidades oferecidas e pela confiança e soli
driedade demonstradas durante estes anos de con
vivência,

... as minhas homenagens.

... ao Prof. João Leonel José, mestre e amigo, pelos ensinamentos dos primeiros passos dentro da carreira docente universitária,

... a minha inesquecível gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Plínio Alves de Moraes, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pela atenção dispensada àqueles que se dedicam ao ensino e à pesquisa;

Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi, DD. Diretor Associado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela disposição e interesse demonstrados;

Ao Prof. Dr. Lourenço Bozzo, da Área de Patologia, pelas valiosas sugestões e críticas construtivas;

À Prof.^a Dr.^a Sônia Vieira, pela orientação e correção dos estudos estatísticos;

Aos queridos colegas da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Profs. Drs. Amado Leonísio de Azevedo, Jonas Vaz de Arruda, José Ranali, Maria de Lourdes Garboggini Gama, Samir Tufic Arbex e Thales Rocha de Mattos Filho, pelo apoio constante e intercâmbio de idéias, durante o transcorrer deste trabalho;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, Ondina de Souza Terra, Rosimar de Castro Barreto, Sebastião de Souza Filho e Walter Rocha, pela compreensão e amizade, nos bons e nos difíceis momentos;

À Sr.^a Ivany do Carmo Guidolim Gerola, Bibliotecária Chefe da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela organização da revisão bibliográfica;

Aos Srs. Antonio Kerches de Campos e Miguel Ângelo Pizzelli, Técnicos de Laboratório da Área de Patologia, pelas excelentes preparações histológicas;

Ao Sr. Adário Cangiani e a Srt.^a Maria de Fátima F. de S. Dantas, pelo capricho na elaboração e montagem da documentação fotográfica;

Ao Sr. Antonio Carlos Benedito, Técnico de Laboratório da Área de Farmacologia, pelos cuidados para com os animais utilizados nesta pesquisa.

A Sr.^a Sônia Maria A. S. V. Favero, pela extrema atenção e eficiência como Secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba;

Ao Sr. Ulysses de Oliveira Martins, Técnico de Laboratório da Área de Farmacologia, pelo auxílio laboratorial e datilográfico;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), cujo auxílio permitiu a realização de nosso Curso de Pós-Graduação,

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

S U M Á R I O

1 - INTRODUÇÃO	pag.	1
2 - PROPOSIÇÃO	pag.	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS	pag.	10
3.1 - Seleção de animais	pag.	10
3.2 - Material usado	pag.	10
3.3 - Implantação das esponjas	pag.	10
3.4 - Distribuição dos grupos experimentais	pag.	11
3.5 - Sacrifício dos animais	pag.	12
3.6 - Coloração com hematoxilina-eosina	pag.	12
3.7 - Técnica histofotométrica para estudos da síntese de mucopolissacarídeos ácidos (gli cosaminoglicanas)	pag.	13
4 - RESULTADOS	pag.	14
4.1 - Coloração com hematoxilina-eosina	pag.	14
4.2 - Técnica histofotométrica	pag.	27
5 - DISCUSSÃO	pag.	32
6 - CONCLUSÕES	pag.	38
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pag.	39
RESUMO	pag.	43
SUMMARY	pag.	44
APÊNDICE	pag.	45

*

* *

1 - INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo homeostático de defesa do organismo, sendo seu mecanismo bastante complexo. A resposta inflamatória a um agente agressor, independente de sua natureza, é iniciada pela liberação local de substâncias farmacologicamente ativas que, entre outras ações, aumentam a permeabilidade dos vasos, permitindo a passagem para o espaço intersticial de líquidos e células provenientes do sangue. Esta exsudação objetiva criar condições favoráveis à destruição ou neutralização do agressor, ou ainda, à reparação dos danos consequentes à agressão. Esta fase de reparação inicia-se com a proliferação de fibroblastos, e a multiplicação de pequenos vasos sanguíneos, através de mitoses de células endoteliais. A proliferação celular penetra no exsudato que é reabsorvido, produzindo uma massa avermelhada altamente vascularizada, denominada tecido de granulação. A formação deste tecido, dentro do mecanismo de reparação de uma lesão é, sem dúvida, o evento mais importante.

Segundo MONTENEGRO & FRANCO (1978), os agentes capazes de produzirem reações granulomatosas são de dois tipos principais:

1- Agentes particulados, inertes, que sendo insolúveis, não podem ser destruídos pelas enzimas das células inflamatórias. Estes granulomas são conhecidos como granulomas de corpo estranho; neles os macrófagos que participam da reação permanecem por longo tempo, e são por isso considerados como granulomas de "turnover baixo". Como exemplo deste tipo de granulomas, pode-se citar os granulomas provocados por fio de sutura não absorvível, talco, gravetos, fragmentos de metal e outros corpos estranhos.

2- O outro tipo de reação granulomatosa é causada por substâncias ou agentes de pequeno poder agressivo, pouco solúveis e de difícil destruição ou remoção. Neste caso, a lesão é dinâmica, os macrófagos chegam, transformam-se em células epitelióides e acabam morrendo, sendo necessária uma contínua che

gada de novos macrófagos para que a lesão se mantenha; são os chamados granulomas de "turnover alto".

A maioria dos granulomas de "turnover alto" é causada por agentes que têm capacidade antigênica e, assim sendo, de les, além dos macrófagos, participam eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. Como exemplo deste tipo de granulomas, tem-se aqueles causados pelo bacilo de Koch, pelos fungos e pelo trepone ma da sífilis.

O tecido de granulação, induzido artificialmente em animais de laboratório, tem sido usado com bons resultados na pesquisa dos mais diversos aspectos ligados à gênese e evolução dos processos de cura do organismo animal. A síntese de colâgeno e seu posterior desenvolvimento foram bastante estudados em tecido de granulação, tanto aqueles obtidos por meio da implantação de corpos estranhos, quanto os obtidos por meio de injúrias produzidas com a finalidade de se obter subsídios para a melhor compreensão dos mecanismos de reparação.

Conseqüentemente, são inúmeras as pesquisas realizadas objetivando o estudo da morfologia do colâgeno, sua cronologia de síntese e maturação, bem como aspectos bioquímicos e fisiológicos dos componentes estruturais que, direta ou indiretamente, participam da formação do tecido de granulação (MADEEN & PEACOCK Jr., 1968; ROSS, 1968; Mc MINN & PRITCHARD, 1969; VIZIOLI, BOZZO & VALDRIGHI, 1972; VIZIOLI, 1973; BAZIN, PELLETIER & DELAUNAY, 1973; COHEN, LEWIS & RESNIK, 1975; VIZIOLI, 1975; DELAUNAY & BAZIN, 1975; ENGLER & JAYLE, 1976; BAZIN, LE LOUS & DELAUNAY, 1976; VIZIOLI, BLUMEN & EL GUINDY, 1976; IM, FRESHWATER & HOOPES, 1976).

Um dos principais aspectos estudados, e que interessa bastante a esta pesquisa, foi aquele relativo ao tempo durante o qual a síntese de colâgeno inicia-se e evolui. A opinião geral dos autores citados, com pequenas variações decorrentes de técnicas de trabalho, é que a síntese de fibras no processo de reparação começa por volta do 4º dia pós-injúria, atingindo o ponto máximo de desenvolvimento entre 15 a 20 dias, decaindo progressivamente após este tempo.

Como é sabido, os passos iniciais na formação de colágeno ocorrem, intracelularmente, nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso dos fibroblastos secretores. O material aí produzido é então transferido para as vesículas do aparelho de

Golgi, ou então diretamente para o espaço extracelular. Moléculas de protocógeno (precursores do colágeno) são lançadas pelas células para o exterior, onde se tornam visíveis pela polimerização que ocorre, ao que tudo indica, do lado externo da membrana celular, mas bem junto a ela. As moléculas de protocógeno extracelulares tornam-se então agregadas tanto lateral quanto longitudinalmente, e formam fibrilas de colágeno, que por sua vez, unem-se em fibras, que podem ser visualizadas ao microscópio óptico.

Quanto à substância fundamental, formada principalmente por um mucopolissacarídeo ácido (ou glicosaminoglicana), o ácido hialurônico, ela é indispensável à agregação do colágeno para formar fibras e feixes, agindo como uma substância "cimentante" que une as fibrilas entre si. Por esta razão, é lógico que de nada adiantaria a formação de fibras colágenas se não houvesse o "cimento" que as agregam.

Os M.P.A. (mucopolissacarídeos ácidos) estão presentes no tecido de granulação desde as primeiras horas e, aumentam bastante durante a fase de proliferação dos fibroblastos que os produzem. De acordo com BENTLEY (1967) e plenamente confirmado por VIZIOLI (1975), o conteúdo de M.P.A. livre no tecido, ou seja, mucopolissacarídeos ácidos não ligados ao colágeno, é bastante grande até os 15 dias após o início do processo, depois do que esta quantidade começa a decrescer. Isso significa que a síntese dessa substância é bastante ativa durante 15 dias, após o que, decresce e os M.P.A. disponíveis no tecido se ligam totalmente às fibras, agregando os feixes de colágeno e produzindo a maturação final do tecido.

Paralelamente a esses estudos morfológicos relacionados com a fase proliferativa do processo inflamatório, encontrou-se na literatura, trabalhos onde a preocupação maior dos autores foi estudar e analisar a influência de certos fatores, intrínsecos ou extrínsecos, sobre a velocidade de síntese de colágeno durante o mecanismo de formação do tecido de granulação. Desta forma, McMINN & PRITCHARD (1969) descreveram como fatores que interferem no processo de reparação animal, a idade e o estado nutricional do organismo, as variações de temperatura, o maior ou menor suprimento sanguíneo da região afetada. HEUGHAM & HUNT (1975); COHEN, LEWIS & RESNIK (1975), assim como SCHILLING (1976), concordaram em afirmar que substâncias

como a Vitamina A, Vitamina C e o Zinco propiciam uma reparação tecidual mais rápida. HEUGHAM & HUNT (1975) relataram que a tensão do oxigênio tissular, o estado hemodinâmico do organismo e a ação de toxinas cumprem um papel relevante na biossíntese do tecido de granulação, ora acelerando-a, ora retardando-a. Está comprovado também que a infiltração local de anestésicos retarda a cura, sendo a reparação ainda mais inibida se os agentes anestésicos contiverem vaso-constritores (BODVALL & RAIS, 1962). Mais recentemente, DURIGHETTO Jr., MATHEUS & MARTINELLI (1978), trabalhando com ratos, concluíram que a aplicação de corrente elétrica de baixa intensidade interfere na reparação cicatricial, provocando aumento do edema, do infiltrado inflamatório e da quantidade de fibroblastos, na fase inicial, e antecipação na maturação do tecido de granulação, na fase final do processo de reparo.

Para completar esta gama de fatores que interveem, através de mecanismos diversos, na cronologia de síntese e maturação do colágeno, é necessário falar-se sobre a ação e o efeito de drogas com propriedades antinflamatórias, um dos objetivos primordiais do presente trabalho.

A maioria dos autores enquadra as drogas antinflamatórias em três grupos:

a) Esteróides, correspondendo aos hormônios corticais da supra renal (corticosteróides), ao ACTH (hormônio adenocorticotrófico) e aos vários produtos sintéticos análogos.

b) Enzimas, como a hialuronidase, a tripsina, a quimo tripsina, a estreptoquinase-estreptodornase, a bromelina, a escina, a alfa-amilase, etc.

c) Não esteróides e não enzimáticas, como os salicilatos, a indometacina, o ácido flufenâmico, a fenilbutazona, a benzidamina e os anti-histamínicos.

Existem inúmeros trabalhos que visam ao estudo da influência destes agentes no processo de reparação do tecido conjuntivo; sem dúvida, os corticosteróides, especialmente os glucocorticóides, foram os mais pesquisados.

À guisa de esclarecimentos, eis algumas opiniões sobre o efeito dessas drogas na biossíntese de colágeno.

"Os glucocorticóides exercem um efeito profundamente

negativo na cura de feridas. O mecanismo básico envolvido in clue uma diminuição da formação de colágeno, conseqüentemente, da fibroplasia" (BAXTER & FORSHAM, 1972).

"Os corticoesteróides inibem a resposta inflamatória, sendo sua ação mais marcante sobre a fase tardia (proliferativa), e, em clínica, são eficazes sobre os processos crônicos como a artrite reumatóide" (LECHAT, 1975).

Outros autores, já anteriormente citados, como McMINN & PRITCHARD (1969), COHEN et alii (1975), HEUGHAM & HUNT (1975), SCHILLING (1976), assim como HOOPS (1966), GOODMAN & GILMAN (1973) e SCHERRER & WHITEHOUSE (1974), são unânimes em afirmar que os antiinflamatórios esteróides têm a propriedade de inibir ou retardar o processo de reparação do tecido conjuntivo, procurando, de alguma maneira, explicar os mecanismos pelos quais tal fenômeno ocorre. HOOPS (1966), relata em seu trabalho que os corticosteróides podem agir inibindo a síntese de mucopolissacarídeos ácidos constituintes da substância fundamental do tecido conjuntivo por uma estabilização das membranas dos lisosomas, diminuindo portanto a atividade das enzimas contidas nesas organelas citoplasmáticas e, conseqüentemente, diminuindo o "pool" de aminoácidos necessários para a subsequente reparação. LECHAT (1975), HEUGHAM & HUNT (1975) e GRELLET & SOUSSALINE (1975), concordam plenamente com este mecanismo.

Por outro lado, também foram realizados estudos dos efeitos de drogas antiinflamatórias não esteróides e não enzimáticas sobre a reparação tecidual.

VELASCO & GUAITERO (1973), fizeram um estudo comparativo dos efeitos da dexametasona (corticosteróide sintético) e da fenilbutazona (não esteróide e não enzimático), utilizando-se das doses de 1 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente, e concluíram que a fenilbutazona foi a droga mais potente em diminuir a resistência tênsil da ferida (36 a 39% de inibição), enquanto que a dexametasona inibiu de 26 a 28%.

Dois anos após, ou seja, em 1975, NAKAMURA & SHIMIZU estudaram comparativamente os efeitos de diversos agentes antiinflamatórios na formação usual de tecido de granulação (uma única implantação de corpo estranho) e na formação acelerada deste mesmo tecido (induzido através de uma dupla implantação de corpos estranhos), e obtiveram os seguintes resultados em relação à fenilbutazona e à dexametasona: ambas as drogas de

mostraram uma atividade inibitória (20% de inibição) do tecido de granulação (formação usual), nas seguintes doses: fenilbutazona (20 mg/kg/dia) e dexametasona (0,03 mg/kg/dia). Entretanto, a fenilbutazona (30 e 100 mg/kg/dia), não demonstrou uma significativa atividade inibitória na formação acelerada do tecido de granulação (uma dupla implantação de corpo estranho), sendo esta inibição menor que 20%. Já a dexametasona (0,01; 0,03 e 0,1 mg/kg/dia) demonstrou uma potente atividade inibitória na formação acelerada deste mesmo tecido. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que o mecanismo de ação inibitória do tecido de granulação dos agentes antiinflamatórios esteróides pode ser diferente daquele apresentado pelos agentes antiinflamatórios não esteróides e não enzimáticos, sem contudo explicar tais fenômenos.

Encontrou-se nas publicações de SCHERRER & WHITEHOUSE (1974) e GOODMAN & GILMAN (1976), uma explicação plausível para a atividade anti-granuloma da fenilbutazona, que interessa sobremaneira a esta pesquisa. Esta droga, segundo esses autores, inibe enzimas do Ciclo de Krebs. A consequente diminuição da produção de energia poderia ter profundos efeitos sobre a biossíntese de muitas substâncias celulares. Assim como os salicilatos (Aspirina), a fenilbutazona é também capaz de desdobrar a fosforilação oxidativa e inibir a síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas), pois esta síntese depende do ATP.

E os antiinflamatórios enzimáticos ?

A história das enzimas proteolíticas remonta ao início deste século. Somente após os estudos experimentais de vários autores sobre a tripsina, destacando-se INNERFIELD, ANGRIST & SCHWARZ (1953); MARTIN (1955) e SELIGMAN (1955), é que realmente surgiram resultados positivos, procurando evidenciar suas implicações clínicas.

A tripsina é uma enzima proteolítica e existe no suco pancreático sob forma inativa (tripsinogênio), só se transformando em tripsina após a ação da enteroquinase do intestino delgado. Seu mecanismo de ação, ainda um pouco polêmico, parece ajustar-se ao conceito de alguns autores (INNERFIELD et alii, 1953; MARTIN, 1955; SPERLI & SAWADA, 1968 e BREYTENBACH, 1971), que concluem: o mecanismo de ação da tripsina se fundamenta na ativação do sistema fibrinolítico do plasma (plasminogênese) e

no restabelecimento do equilíbrio do complexo vascular linfático intersticial através da lise dos depósitos de fibrina nos tecidos inflamados e edemaciados. SPERLI, SAWADA & CHVINDELMAN (1967) relatam ainda que a tripsina é inóqua, devido ao fato de existir um equilíbrio físico-bioquímico entre os fatores proteolíticos e antiproteolíticos circulantes no organismo. Portanto, não atacam os elementos celulares vivos, devidos a receberem a ação antagônica dos fatores anti-proteolíticos endocelulares.

O uso clínico da tripsina tem sido indicado em quatro áreas distintas, como para as desordens gastrintestinais, para a lise de coleções proteicas, como coadjuvante na terapêutica de doenças tromboembólicas e como antiinflamatório.

São carentes, porém, estudos específicos dos efeitos da tripsina sobre a cronologia de biossíntese e maturação do colágeno. Deparou-se apenas com citações e sugestões de alguns pesquisadores conferindo propriedades deste agente medicamento so em favor da cicatrização. Por exemplo, ouçamos DAHER, HERCOS Fº & CUNHA PRATA (1968): " O uso das enzimas proteolíticas em Cirurgia Geral com a finalidade de facilitar a drenagem tissular para reduzir tanto o edema como a dor de caráter inflamatório, condicionando desta forma uma melhor e mais rápida cicatrização, vem se repetindo cada vez mais e justificando a indicação clínica da tripsina na inflamação, qualquer que seja a causa desencadeante".

De fato, dez anos antes, ou seja, em 1958, SPIEGEL estudou 86 casos de alveolite na espécie humana, evidenciando a efetividade da tripsina na redução do tempo de cura dessa infecção pós-extração dentária. O autor utilizou-se de duas doses de 5 mg, administrada intramuscularmente. Obteve também resultados favoráveis com esta droga no tratamento de periocoronarites, celulites, abscessos alveolares e sinusites maxilares em conjunto com a reparação de fístulas sinusais. Admitiu paralelamente que o tratamento com enzimas proteolíticos não possui contra-indicações; não foram observados efeitos colaterais ou secundários, e não houve interferência no mecanismo da coagulação sanguínea. Concluiu finalmente que as enzimas proteolíticas são valiosas quando usadas em Cirurgia Oral, encorajando estudos futuros.

Em 1967, no Congresso Internacional de Cirurgia Plás

tica, realizado em Roma, Itália, SPERLI & SAWADA apresentaram um trabalho experimental em ratos sobre retalhos tegumentares em Cirurgia Plástica, e provaram que a associação de uma enzima proteolítica (tripsina - 0,1 mg/kg/12 hs.) com um vasodilatador (butil-nor-simpatol), abreviou o tempo de reação histológica de reparação, o que é de grande utilidade para o prognóstico dos retalhos e, analogamente, para a cura do organismo animal.

2 - PROPOSIÇÃO

No intuito de confirmar-se algumas das assertivas anteriormente descritas, bem como esclarecer certos aspectos ainda não bem elucidados, propõe-se neste trabalho:

- A - Acompanhar a gênese e a proliferação de colágeno no tecido de granulação, desde uma fase precoce até sua maturação;
- B - Estudar comparativamente os efeitos de agentes anti-inflamatórios com princípios ativos diversos: um esteróide (dexametasona 21-fosfato), um enzimático (tripsina) e um esteróide e não enzimático (fenilbutazona), na biossíntese e maturação de colágeno, neste mesmo tecido.
- C - Confrontar os resultados obtidos nos itens A e B. Com base nesse confronto, procurar estabelecer as correlações existentes entre o ritmo normal de síntese e maturação do colágeno e as possíveis alterações deste ritmo quando submetido aos efeitos de drogas anti-inflamatórias.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - SELEÇÃO DE ANIMAIS

Foram utilizados para esta pesquisa 40 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), adultos jovens (120 dias), machos, pesando entre 160 e 185 g. Os animais foram escolhidos e, após desmamados, alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum". A limpeza das gaiolas, assim como a troca da alimentação, foram realizadas diariamente. Atingida a idade desejada, os ratos foram submetidos aos procedimentos de implantação das esponjas.

3.2 - MATERIAL USADO

- campânula de vidro
- mesa cirúrgica para ratos
- tesouras de ponta fina e ponta romba
- pinças diversas
- placas de Petri
- porta-agulhas
- agulhas de sutura
- seringas centesimais de 1,0 ml
- agulhas hipodérmicas descartáveis
- esponjas de policlorovinil (PVC)
- fios de algodão para sutura
- algodão hidrófilo e gaze esterilizada
- solução antisséptica (Germ-Hand, Darrow Laboratórios S/A)
- éter sulfúrico (Indafarma, Ind. e Com. Prod. Químicos)

3.3 - IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

Fragmentos de esponjas de policlorovinil (PVC) medindo 0,7 X 0,7 X 0,7 cm., esterilizadas em autoclave, foram implantados subcutaneamente nos animais, da seguinte maneira:

Após anestesia com éter sulfúrico, depilou-se a região

dorsal mediana traseira dos animais, e praticou-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm, paralelamente ao longo eixo da coluna vertebral. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, procedeu-se à divulsão dos tecidos, para facilitar a introdução da esponja. A esponja foi introduzida com um pinça apropriada, tão longe quanto possível do local da incisão, com o objetivo de evitar que a formação do tecido de granulação fosse prejudicada pelo processo de cicatrização da incisão. Uma vez implantada a esponja, a incisão foi suturada com 2 pontos separados. Todos esses procedimentos descritos foram conduzidos sob rigorosas condições de assepsia.

O momento no qual foi realizada a implantação do fragmento de esponja, passou a ser denominado em nosso experimento, de Tempo Zero.

3.4 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em 04 grupos, cada um contendo 10 ratos, sendo 02 para reserva. Esse cuidado tornou-se necessário, devido à possibilidade de ocorrer um processo infeccioso ou mesmo a morte de algum animal.

Após marcados, para facilitar a identificação, os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos:

GRUPO A - Os animais deste grupo, a partir do Tempo Zero, foram injetados com tripsina, via intraperitoneal, na dosagem de 0,1 mg/kg/dia.

GRUPO B - Os animais deste grupo, a partir do Tempo Zero, foram injetados com fenilbutazona, via intraperitoneal, na dosagem de 20 mg/kg/dia.

GRUPO C - Os animais deste grupo, a partir do Tempo Zero, foram injetados com solução salina (0,9%), via intraperitoneal, diariamente. Diante disso, foi denominado de Grupo Controle.

GRUPO D - Os animais deste grupo, a partir do Tempo Zero, foram injetados com dexametasona 21-fosfato, via intraperitoneal, na dosagem de 0,1 mg/kg/dia.

As drogas utilizadas foram:

tripsina - PARENZYME AQUOSO, Richardson Merrell - Moura Brasil S/A.

fenilbutazona - BUTAZOLIDINA, Ciba-Geigy Química S/A
dexametasona 21-fosfato - DECADRON, Merck Sharp e Dohme, Ind. Química e Farmacêutica Ltda.

É necessário frisar-se que os animais foram pesados diariamente e, os volumes injetados calculados a partir dessas pesagens. Procurou-se deste modo, evitar a administração de doses menores ou maiores que as previstas e estabelecidas anteriormente. Os volumes injetados foram padronizados de acordo com o peso dos animais, independente do grupo, descartando-se assim a possibilidade deste fator interferir em algum resultado. Os intervalos de administração das drogas (24 hs.), foram rigorosamente obedecidos.

3.5 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram novamente anestesiados com éter sulfúrico e, após tal procedimento, foram removidos os tecidos para estudo. Feitas as remoções, os animais foram sacrificados com golpe occipital. Os tempos de sacrifício, em relação ao momento das implantações das esponjas (Tempo Zero), foram: 07, 14, 21 e 28 dias. Para cada tempo foram sacrificados 02 elementos de cada grupo. Escolheu-se o início da avaliação a partir do 7º dia, pois, neste tempo a fase proliferativa da resposta inflamatória está bem estabelecida.

3.6 - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Um lote de 32 ratos, sendo 08 por grupo e 02 para cada dia de sacrifício forneceram material para os estudos comparativos de morfologia e evolução quantitativa do tecido de granulação.

Sacrificados os animais e retirados os tecidos de granulação, estes foram rapidamente lavados em solução fisiológica e fixados em formol cálcio a 10%, durante 24 hs, à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram incluídos segundo a técnica de rotina e corados com hematoxilina-eosina.

3.7 - TÉCNICA HISTOFOTOMÉTRICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS (GLICOSAMINOGLICANAS)

Utilizando-se dos tecidos fixados e incluídos, de acordo com a descrição do item anterior, as peças histológicas foram cortadas novamente na espessura de 07 micra. Para a evidência histoquímica dos mucopolissacarídeos ácidos, foi empregada a técnica metacromática do azul de toluidina, pH 4, segundo indicado por LISON (1960).

Uma vez prontas, as lâminas foram montadas em meio sintético (Balsamo do Canadá, CAEDAX, E. Merck. Darmstad) e, levadas ao histofotômetro (MICROSCOPE-PHOTOMETER ZEISS 01), utilizando-se a objetiva de 40 aumentos e luz monocromática na faixa de 540 milimicrons, como indicado por PEARSE (1968). Todos os pontos do tecido de granulação foram colocados sob medida, realizando-se um total de 30 medidas para cada lâmina examinada, 02 lâminas de cada grupo para cada dia de evolução do tecido de granulação, sendo cada lâmina de um animal diferente.

Os valores médios dessa medidas, por rato e por grupo, em cada tempo de estudo, foram então submetidos a uma análise de variância e ao teste t de Tukey.

4 - RESULTADOS

4.1 - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

O tecido envolvido na área inflamada respondeu à agres são do corpo estranho, no caso a esponja de PVC, com fenômenos proliferativos. Estes são caracterizados por uma proliferação de vasos e de fibroblastos que se dispõem à volta da área inju riada. Os fibroblastos iniciam a deposição de colágeno, e ao fim de alguns dias forma-se ao redor da esponja uma cápsula fi brosa, que identifica uma reação inflamatória de corpo estra nho. É a partir dessa cápsula fibrosa que os elementos celula res migram para o interior da esponja, através de seus poros, e começa a proliferar.

A sequência de proliferação dos tecidos de granulação, nos dias de desenvolvimento estudados, dentro dos diferentes grupos, foi a seguinte:

7 DIAS-: Conforme a Figura 1, tomando por padrão a fo to C, correspondente ao tecido que não sofreu a interferência de agentes medicamentosos (Grupo Controle), notou-se primeir amente a cápsula fibrosa envolvente já perfeitamente delineada. A partir desta cápsula, o tecido de granulação ainda incipien te começou a proliferar. Esta proliferação é melhor caracteri zada na Figura 2 (C), onde observou-se a presença de fibroblas tos, células mesenquimais e não-formação de vasos capilares san guíneos. Analisando-se comparativamente os demais tecidos, ob tidos de animais que receberam tratamento com agentes antinfla matórios, com o tecido descrito, pode-se notar que os tecidos mostrados nas fotos B (Figura 1 e Figura 2), correspondentes ao grupo de animais tratados com fenilbutazona, demonstrou uma menor proliferação, conseqüentemente, uma menor quantidade de fibroblastos e capilares não-formados. Mais inibido ainda se mostrou o tecido obtido dos animais injetados com dexametasona 21-fosfato. As Figuras 1 e 2 (fotos D), constituem-se em docu mentos preciosos para mostrar um tecido incipiente, com poucas células e vasos. Por outro lado, os tecidos obtidos de animais

tratados com tripsina mostraram-se, a partir da cápsula, altamente proliferativos, com um grande número de capilares neo-formados, repletos de sangue circulante e fibroblastos com núcleos grandes e citoplasma irregular. A vista geral deste tecido pode ser observada na Figura 1 (A) e, os detalhes em maior aumento na Figura 2 (A).

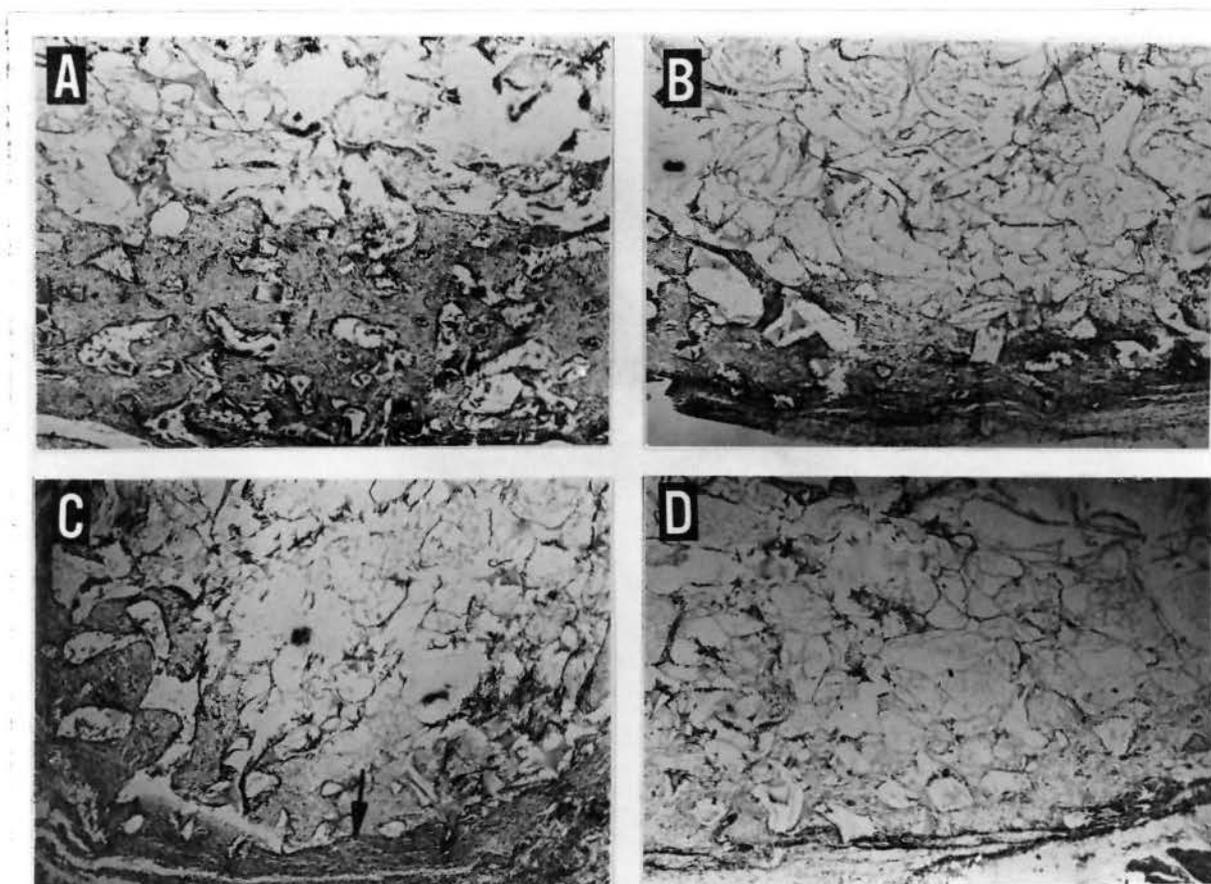


FIGURA 1 - Tecidos de granulação dos diferentes grupos, aos 7 dias de desenvolvimento. Observe-se na foto C, a cápsula fibrosa envolvente (seta) Aumento original - 12X

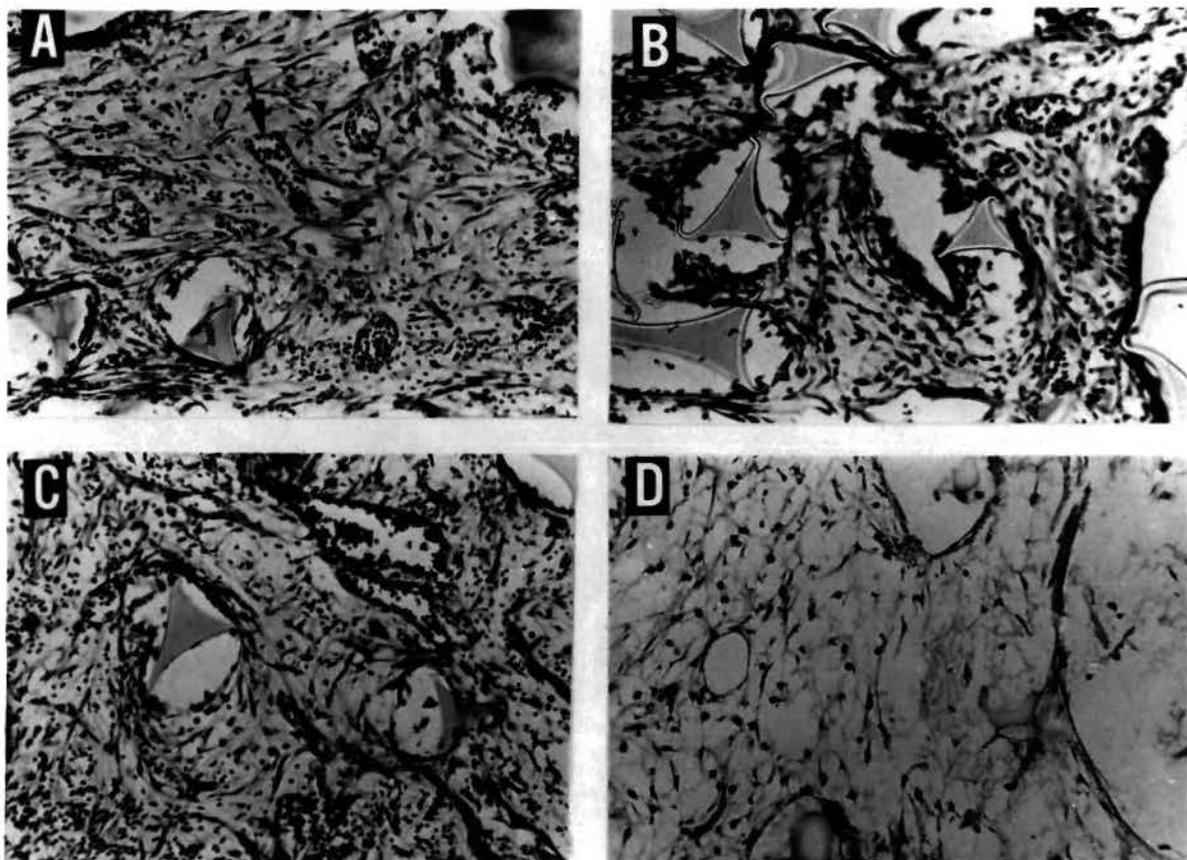


FIGURA 2 - Tecidos de Granulação, aos 7 dias. Note-se a intensa proliferação de capilares sanguíneos nos tecidos obtidos de animais tratados com a tripsina (seta) Aumento original 63X

14 DIAS-: A vista geral em pequeno aumento, proporcionada pela Figura 3, mostrou que, com exceção do Grupo D (Foto D) a proliferação do tecido atingiu toda a periferia da cápsula fibrosa envolvente. O fibrosamento do tecido é maior e ocupou quase todos os espaços da esponja, que, a esta altura, começou a ser comprimida. Notou-se que os feixes de colágeno dos tecidos do Grupo A (Foto A) estão mais compactos e melhor direcionados que os dos Grupos C (Controle) e, em maior proporção, aos do Grupo B (fenilbutazona). A Figura 4, em maior aumento, confirmou tais observações. Além disso, mostrou uma proliferação de vasos com sangue circulante, principalmente observados na Foto A. Notou-se também a presença de células gigantes fagocitárias. O aspecto do tecido mostrado na Foto D (dexametasona 21-fosfato) é de uma quase total inibição proliferativa, caracterizada pela ausência de feixes de fibras colágenas e vasos sanguíneos capilares néo-formados.

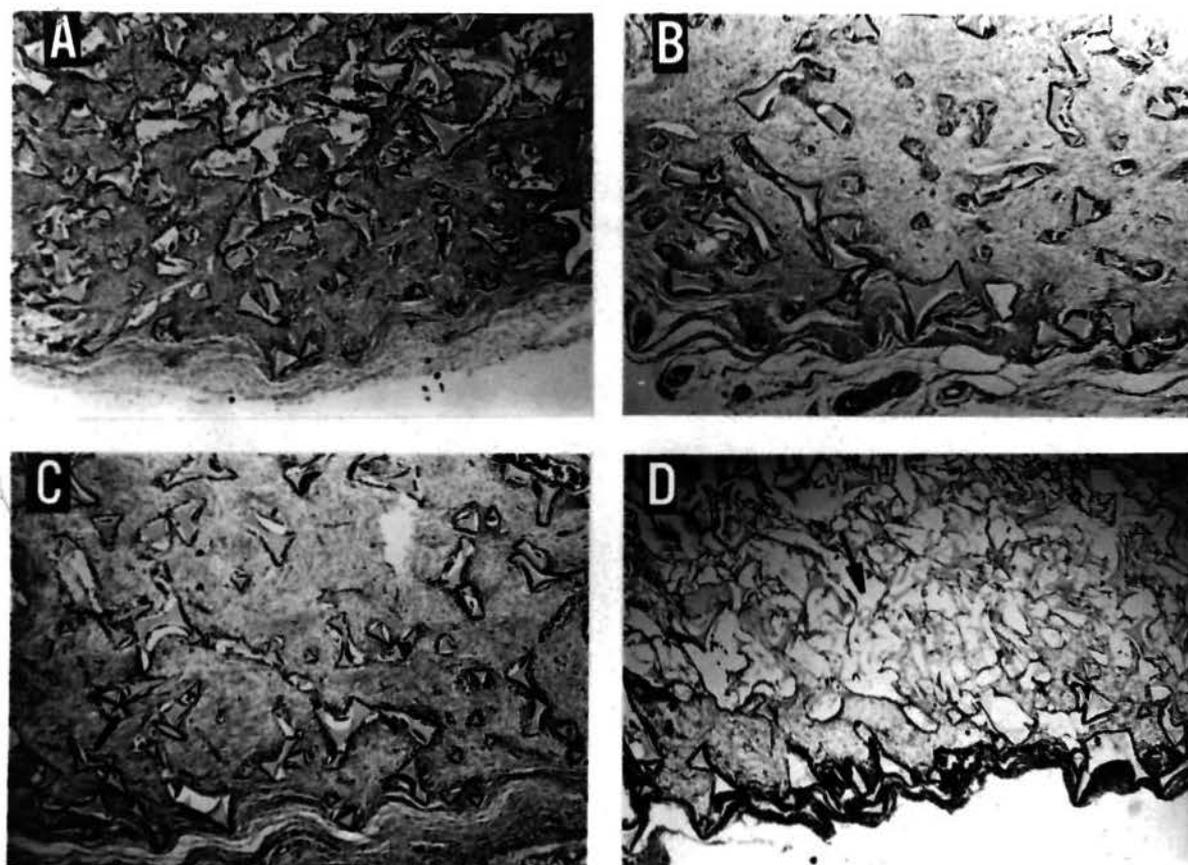


FIGURA 3 - 14 dias de evolução dos tecidos. Os feixes de colágeno do tecido do Grupo A, tratado com tripsina (foto A), estão melhor direcionados que os dos demais grupos (seta). Aumento original 12X

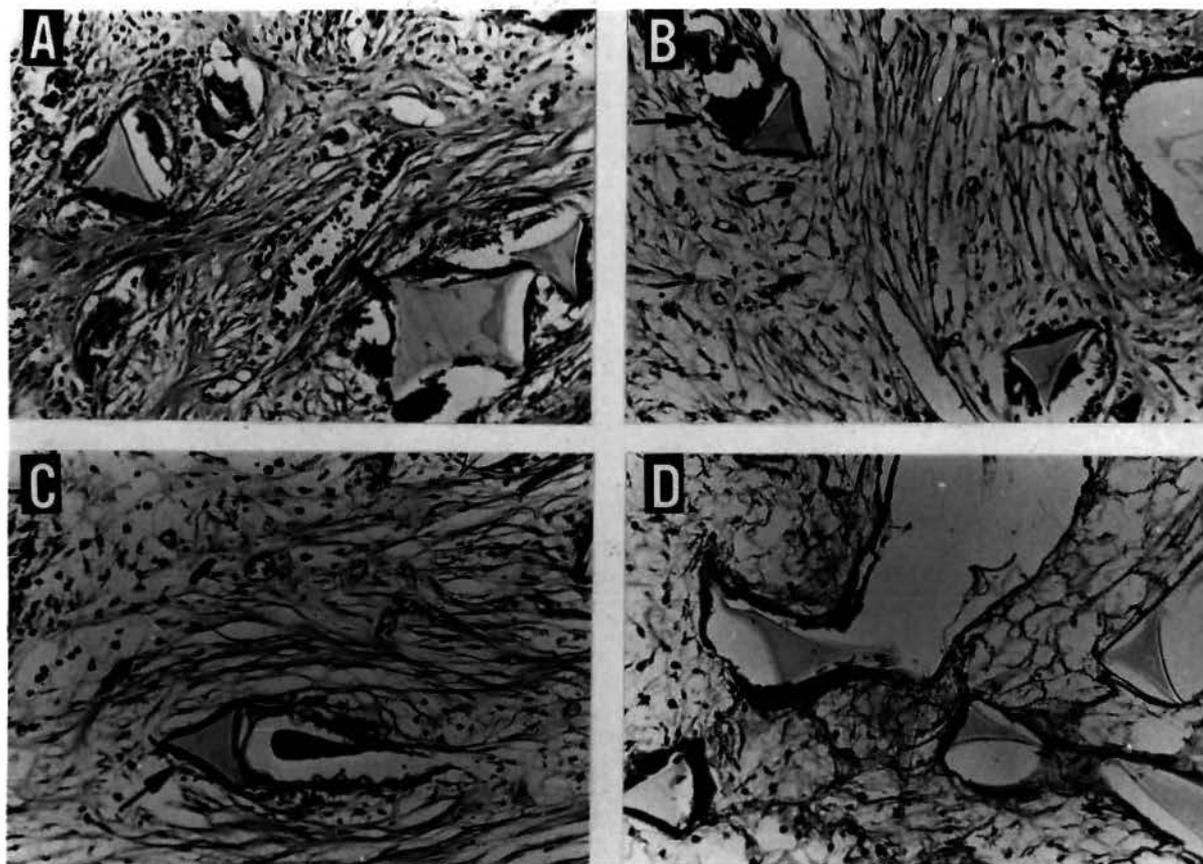


FIGURA 4 - Mesmo tempo de estudo (14 dias), confirmando as observações anteriores. Note-se também a presença de células gigantes fagocitárias, contendo fragmentos da esponja em seu interior (seta) Aumento original 63X

21 DIAS-: Após três semanas de evolução, as diferenças entre os quatro grupos, quanto ao grau de maturação dos tecidos, foram proporcionais às aquelas descritas nos tempos de 7 e 14 dias. A Figura 5 mostra, em pequeno aumento, uma vista geral dos tecidos de cada grupo. Notou-se que o fibrosamento continuou aumentando, diminuindo consideravelmente os espaços dos poros da esponja. Foi visível a inibição da síntese e maturação do colágeno do tecido, pertencente ao Grupo D (Foto D), tratado com dexametasona 21-fosfato. Esta inibição ficou ainda mais caracterizada na Figura 6 (Foto D), onde notou-se a ausência de feixes direcionados de colágeno, destacando espaços vazios (seta). Por outro lado, na mesma Figura 6, Foto A, correspondente ao tecido tratado com tripsina, apresentou um grande fibrosamento (seta), com diminuição da população fibroblástica, que indicou a maturação do tecido de granulação. Pode-se sugerir que, comparativamente, este tecido está melhor organizado que o do Grupo Controle (Foto C) e que este, por sua vez, é superior qualitativa e quantitativamente ao do Grupo B (Foto B), tratado com fenilbutazona.

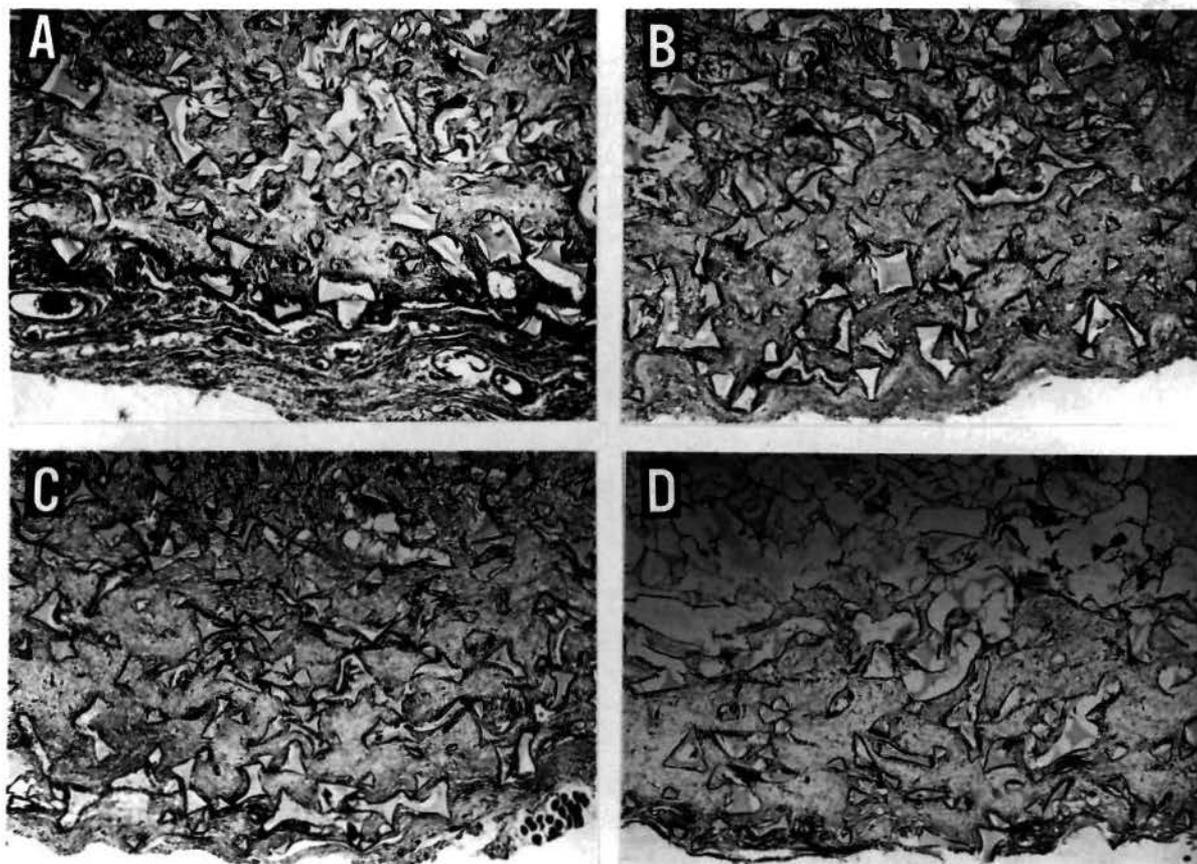


FIGURA 5 - Tecidos de Granulação, 21 dias pós implantação. O fibrosamento continuou aumentando, com exceção do tecido tratado com dexametasona 21-fosfato, que permanece cronologicamente inibido, (foto D) Aumento 12X

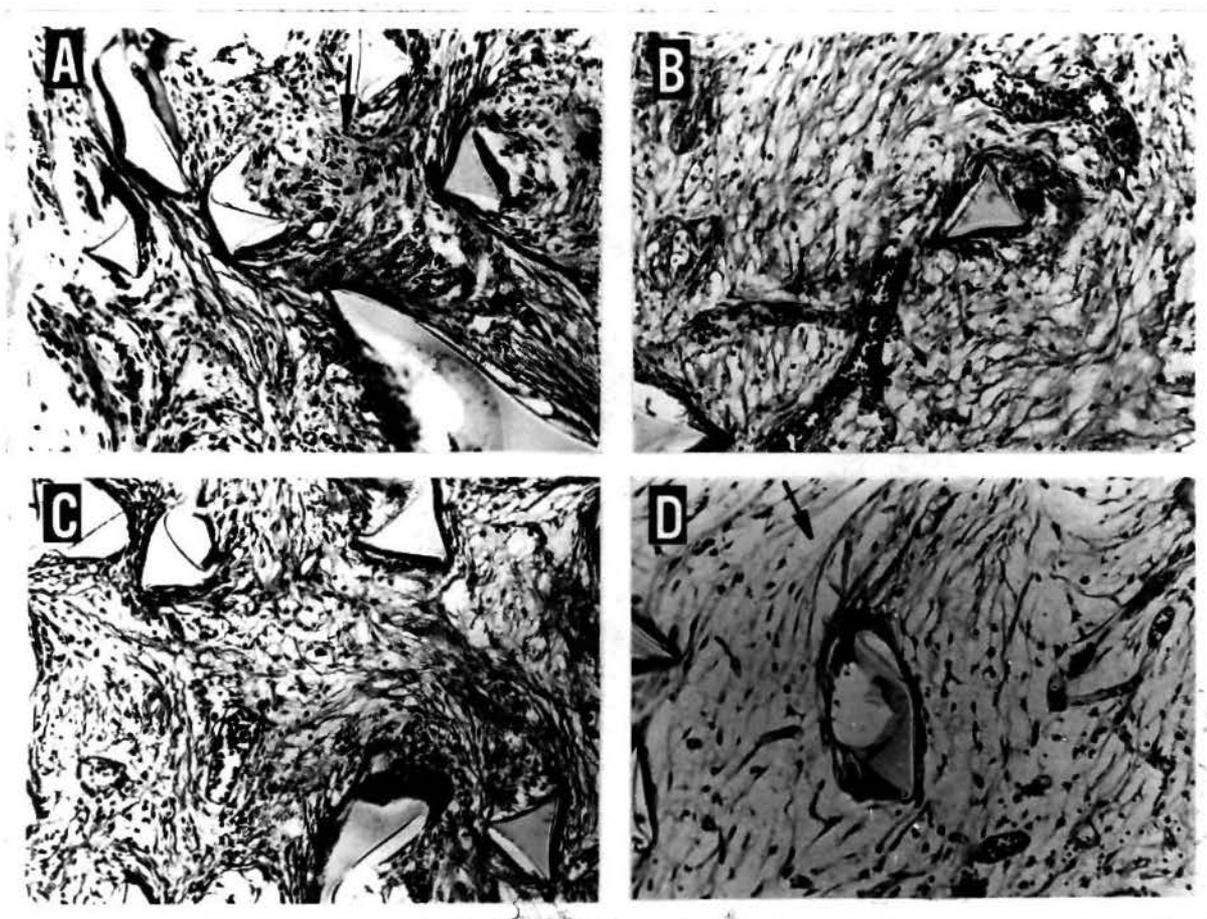


FIGURA 6 - 21 dias de evolução dos tecidos. Note-se na foto D, os espaços vazios (seta) deixados pelo tecido incipiente, constatando-se nitidamente com o grande fibrosamento apresentado pelo tecido tratado com tripsina. (seta). Aumento 63X

28 DIAS-: Os tecidos dos Grupos A (tripsina) e C (Controle), neste tempo, apresentaram-se completamente maduros. Esossos feixes de fibras colágenas tomaram todos os espaços da esponja. A celularidade diminuiu bruscamente, assim como a neo formação de capilares sanguíneos. A Foto B da Figura 8 mostrou que o tecido relativo ao Grupo tratado com fenilbutazona ainda apresentava um discreto infiltrado inflamatório, que demonstra sua menor maturidade em relação aos tecidos dos Grupos A e C. Paralelamente, o tecido obtido do animal tratado com dexameta sona 21-fosfato continuou cronologicamente retardado, conforme se pode observar nas Figuras 7 e 8, Fotos D.

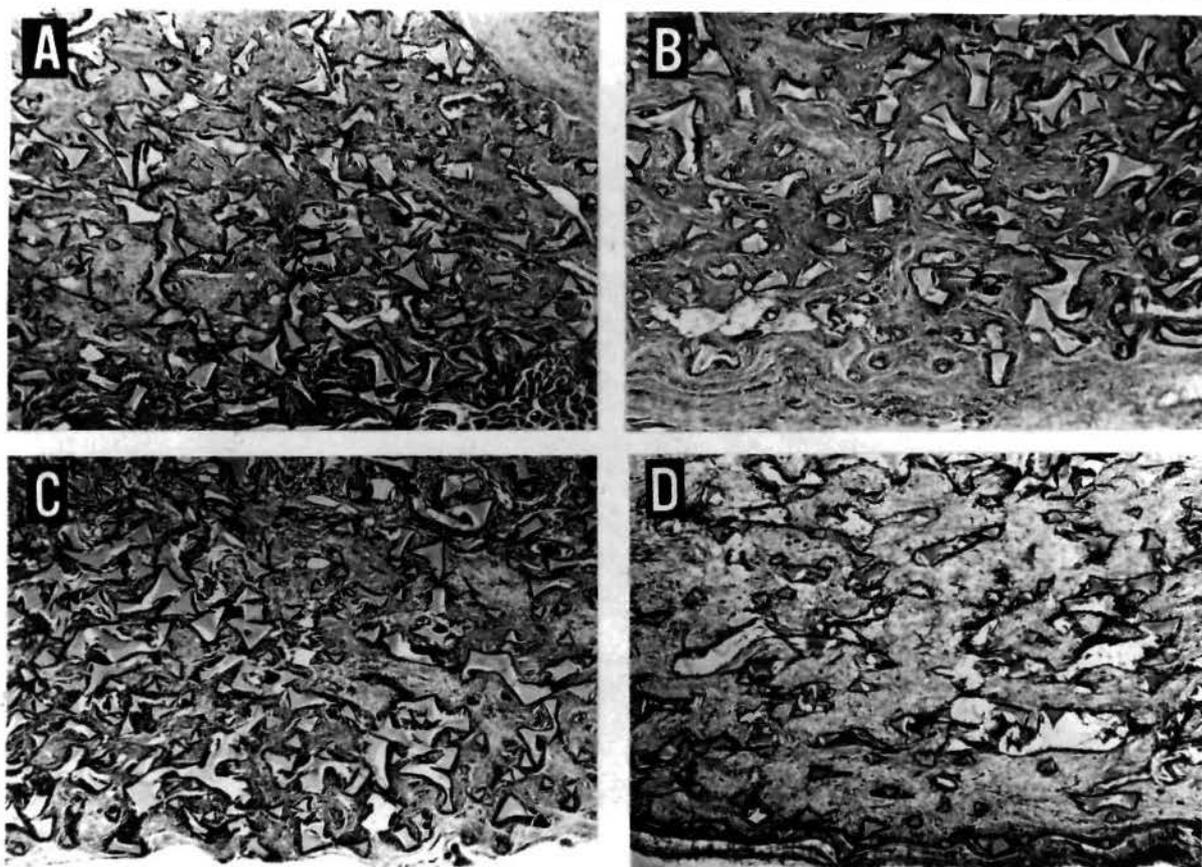


FIGURA 7 - 28 dias de desenvolvimento dos tecidos. Os relativos aos grupos A, B e C (fotos A, B e C) mostram-se bastante evoluídos. O relativo ao grupo D (foto D) continua imaturo. Aumento 12X

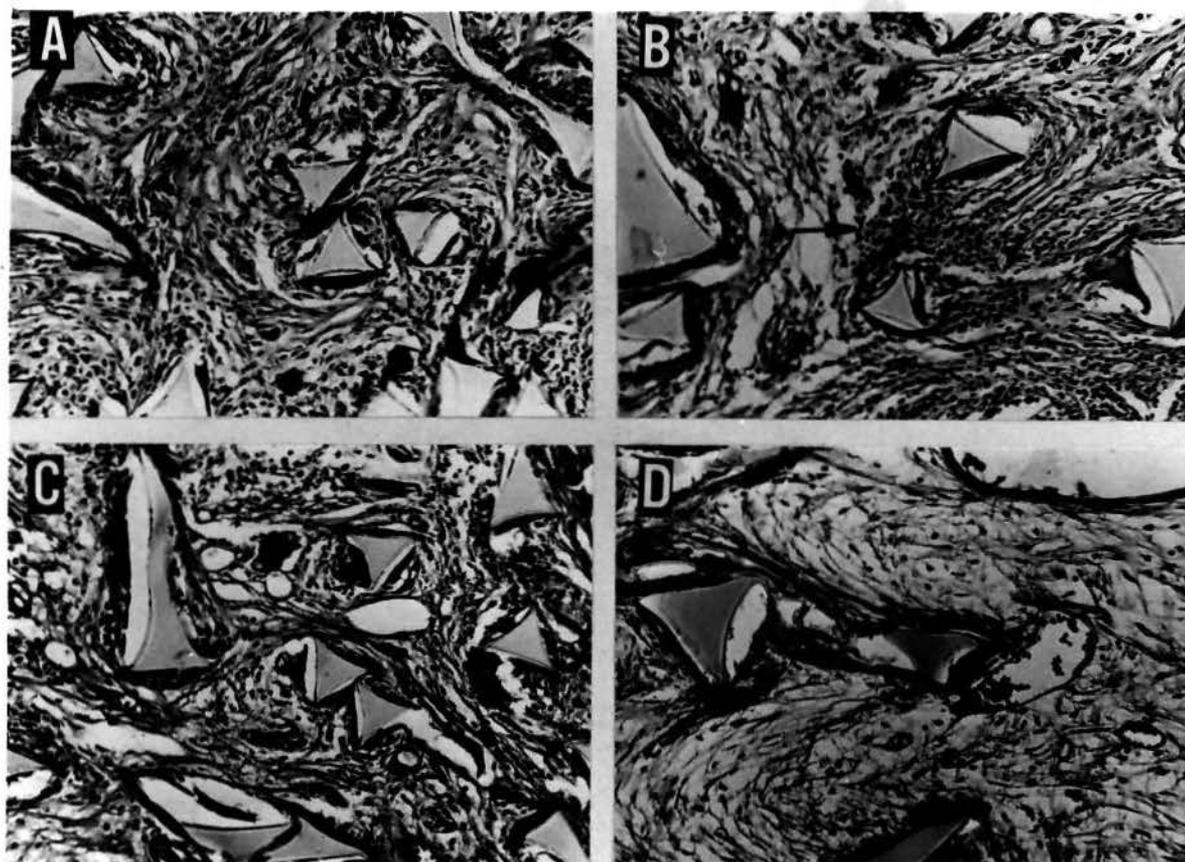


FIGURA 8 - Tecidos de Granulação, aos 28 dias de estudo. Observe-se que a celularidade e a neoformação de capilares diminuíram bruscamente. O tecido obtido do grupo B, injetado com fenilbutazona, apresenta um discreto infiltrado inflamatório (seta) Aumento 63X

4.2 - TÉCNICA HISTOFOTOMÉTRICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS (GLICOSAMINOGLICANAS)

As medidas obtidas por meio das observações histofotométricas das lâminas de tecido de granulação nos diferentes dias de evolução estudados, encontram-se no Apêndice. Estes dados foram então submetidos a análise de variância e ao teste t de Tukey.

Os valores médios dessas medidas, por rato e por grupo, em cada tempo de estudo, estão apresentados nas Tabelas 1, 3, 5 e 7.

7 DIAS

TABELA 1 - Valores médios das medidas histofotométricas, expressas em porcentagem de transmitância de luz e as respectivas médias, relativas a lâminas histológicas dos ratos de diferentes grupos, aos 7 DIAS de desenvolvimento do tecido.

RATO	GRUPO	A	B	C	D
1		78,2	84,6	80,2	89,0
2		79,0	85,2	80,1	90,2
MÉDIA		78,6	84,9	80,1	89,6

Os dados apresentados na Tabela 1 foram submetidos a uma análise de variância com um critério de classificação, conforme mostra a Tabela 2.

TABELA 2 - Análise de variância relativa aos dados da Tabela 1.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GRUPO	3	148,52	49,5067	161,00
RESÍDUO	4	1,23	0,3075	
TOTAL	7	149,75		

O valor de F, apresentado na Tabela 2, é significativo ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi feito o teste t de Tukey. O valor da diferença mínima significativa, ao nível de 5%, obtida através deste teste, é 2,26. Com base nesse resultado, pode-se afirmar que, em média, as medidas histofotométricas obtidas no Grupo D são maiores do que as medidas obtidas nos Grupos A, B e C. Também se pode afirmar que, em média, as medidas obtidas no Grupo B são maiores do que as obtidas para os Grupos A e C.

G.L.= Grau de Liberdade

S.Q.= Soma dos Quadrados

Q.M.= Quadrado Médio

14 DIAS

TABELA 3 - Valores médios de medidas histofotométricas, expressas em porcentagem de transmitância de luz e as respectivas médias, relativas a lâminas histológicas dos ratos de diferentes grupos, aos 14 DIAS de desenvolvimento do tecido.

RATO	GRUPO	A	B	C	D
1		72,6	81,7	76,7	90,9
2		72,7	81,4	74,3	89,2
MÉDIA		72,6	81,5	75,5	90,0

Os dados apresentados na Tabela 3 foram submetidos a uma análise de variância com um critério de classificação, conforme mostra a Tabela 4.

TABELA 4 - Análise de variância relativa aos dados da Tabela 3.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GRUPO	3	355,32	118,4400	108,16
RESÍDUO	4	4,38	1,0950	
TOTAL	7	359,7		

O valor de F, apresentado na Tabela 4, é significativo

ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi feito o teste t de Tukey. O valor da diferença mínima significativa, ao nível de 5%, obtida através deste teste, é 4,26. Com base nesse resultado, pode-se afirmar que, em média, as medidas histofotométricas obtidas no Grupo D são maiores do que as medidas obtidas nos Grupos A, B e C. Também se pode afirmar que, em média, as medidas obtidas no Grupo B são maiores do que as obtidas para os Grupos A e C.

21 DIAS

TABELA 5 - Valores médios de medidas histofotométricas, expressas em porcentagem de transmitância de luz e as respectivas médias, relativas a lâminas histológicas dos ratos de diferentes grupos, aos 21 DIAS de desenvolvimento do tecido.

RATO	GRUPO	A	B	C	D
1		70,3	78,7	72,0	89,5
2		69,7	79,0	72,3	89,9
MÉDIA		70,0	78,9	72,1	89,7

Os dados apresentados na Tabela 5 foram submetidos a uma análise de variância com um critério de classificação, conforme mostra a Tabela 6.

TABELA 6 - Análise de variância relativa aos dados da Tabela 5.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GRUPO	3	470,83	156,9433	1793,64
RESÍDUO	4	0,35	0,0875	
TOTAL	7	471,18		

O valor de F, apresentado na Tabela 6, é significativo ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi feito o teste t de Tukey. O valor da diferença mínima significativa, ao nível de 5%, obtida através deste teste, é 1,20. Com base nesse resultado, pode-se afirmar que, em média, as me

didadas histofotométricas obtidas no Grupo D são maiores do que as medidas obtidas nos Grupos A, B e C. Também se pode afirmar que, em média, as medidas obtidas no Grupo B são maiores do que as obtidas para os Grupos A e C. Finalmente, a basear-se nesses resultados, pode-se afirmar que, em média, as medidas obtidas no Grupo C são maiores do que as obtidas para o Grupo A.

28 DIAS

TABELA 7 - Valores médios de medidas histofotométricas, expressas em porcentagem de transmitância de luz e as respectivas médias, relativas a lâminas histológicas dos ratos de diferentes grupos, aos 28 DIAS de desenvolvimento do tecido.

RATO	GRUPO	A	B	C	D
1		75,3	79,9	79,2	86,7
2		76,6	80,2	78,8	83,2
MÉDIA		75,9	80,1	79,0	85,0

Os dados apresentados na Tabela 7 foram submetidos a uma análise de variância com um critério de classificação, conforme mostra a Tabela 8.

TABELA 8 - Análise de variância relativa aos dados da Tabela 7.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
GRUPO	3	83,81	27,9367	15,74
RESÍDUO	4	7,10	1,7750	
TOTAL	7	90,91		

O valor de F, apresentado na Tabela 8, é significativo ao nível de 5%. Para comparar as médias de grupos, duas a duas, foi feito o teste t de Tukey. O valor da diferença mínima significativa, ao nível de 5%, obtida através deste teste, é 5,42. Com base nesse resultado, pode-se afirmar que, em média, as medidas histofotométricas obtidas no Grupo D são maiores do que as obtidas para os Grupos A e C.

Com a finalidade de melhor visualizar a variação da quantidade de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas), contidos nos tecidos de granulação dos diferentes grupos de animais, em função do tempo de estudo, traçou-se o Gráfico 1. Este gráfico apresenta as médias das medidas histofotométricas, expressa em porcentagem de transmitância de luz, contra o tempo, em dias.

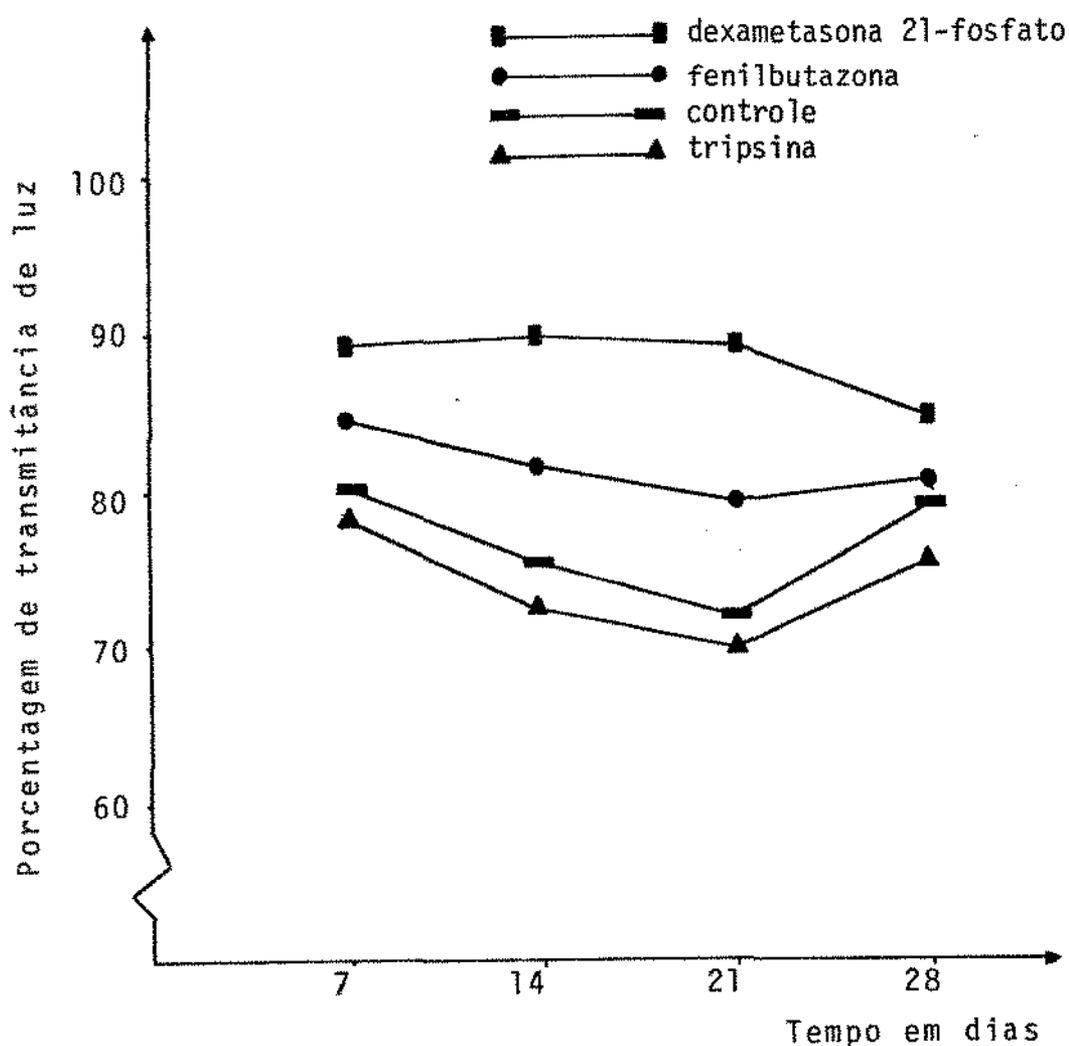


GRÁFICO 1 - Curvograma para as médias de transmitância de luz, em função do tempo de sacrifício.

5 - DISCUSSÃO

A formação do tecido de granulação, em resposta ao estímulo provocado pela esponja, inicia-se entre o 3º e o 4º dia pós-implantação, através da migração de células fibrogenéticas e totipotentes originárias da cápsula fibrosa reacional, com conseqüente proliferação desses elementos celulares até por volta de 20 dias de evolução, quando então a fase proliferativa propriamente dita termina e estabelece-se a organização e maturação do tecido. Estas afirmações encontram suporte científico nas investigações realizadas por WOESSNER Jr. & BOUCEK (1961) até VIZIOLI (1975).

Os parâmetros utilizados para tais avaliações prendem-se a quantidade de células fibroblásticas e mesenquimais, síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas) e neoformação de capilares sanguíneos encontrados nos tecidos. Com a evolução progressiva da resposta proliferativa, tornam-se subsídios importantes o teor de colágeno presente, bem como sua agregação em forma de feixes e o direcionamento organizado da do aos mesmos.

Baseando-se nessas observações, feitas através de cortes histológicos corados com H.E., como também obedecendo as leituras histofotométricas realizadas, pôde-se acompanhar a gênese e a proliferação de colágeno no tecido de granulação obtido de animais sob condições normais e comparar este padrão tecidual com os tecidos obtidos de animais tratados com drogas antiinflamatórias.

Antes de começar a discutir-se os resultados obtidos na presente pesquisa, torna-se oportuno relatar um conceito formulado por ROSS (1968): "Sendo a inflamação o fator básico necessário a um rápido e contínuo estímulo para a fibrogênese, um controle adequado, porém nunca inibitório, resulta em melhor evolução de um processo tecidual de reparação".

O estudo morfológico do tecido de granulação que não sofreu interferência medicamentosa (animais do Grupo C) veio confirmar, nesta pesquisa, alguns aspectos abordados em trabalhos anteriores. Por exemplo, pode-se dizer que os fenômenos proliferativos da resposta inflamatória realmente encontram-se

estabilizados aos 7 dias de evolução do tecido, reforçando-se o conceito emitido por SCHERRER & WHITEHOUSE (1974), e que serviu de fundamento científico para iniciar-se os estudos morfológicos a partir deste tempo de sacrifício. Outro fato importante foi a constatação, através das leituras histofotométricas, que a síntese de mucopolissacarídeos ácidos (MPA) aumenta gradativamente, atingindo a fase mais ativa entre os 14 e 21 dias de evolução do tecido, decaindo posteriormente. Estes achados são concordantes com as investigações realizadas por VIZIOLI (1973) e (1975); VIZIOLI et alii (1972) e (1976), e foram interpretados de uma maneira bastante lógica por estes autores. Segundo os mesmos, somente os mucopolissacarídeos ácidos livres no tecido têm condições de reagir e se ligar com as moléculas de corante metacromático (azul de toluidina). Sabendo-se que estas reações são detectadas através de um método sensível como a histofotometria, deduz-se que quanto maior a quantidade de moléculas de MPA livres, um maior número de reações acontecem, e a porcentagem de luz que atravessa o tecido e que é enviada ao histofotômetro, será proporcionalmente menor. A partir dos 21 dias de desenvolvimento do tecido, os MPA (glicosaminoglicanas) se agregam, se incorporam aos feixes de colágeno e, obviamente, menos reações metacromáticas acontecem e maior é a porcentagem de transmitância de luz, expressas por leituras numericamente maiores.

Os valores das medidas obtidas dos tecidos de animais sob condições normais foram submetidos a uma análise estatística, que confirmou a cronologia quantitativa de síntese dos MPA, cujas médias se encontram demonstradas no Gráfico 1.

Fundamentando-se nesses conceitos, pode-se discutir, em termos comparativos, os efeitos provocados na síntese e maturação do colágeno, pelas drogas antiinflamatórias estudadas.

Analisando-se inicialmente a proliferação dos tecidos de granulação de animais tratados com a dexametasona 21-fosfato (Grupo D), pode-se afirmar, sem margem de erro, que este corticosteróide sintético, na dose de 0,1 mg/kg/dia tem a propriedade de inibir a evolução e a maturação do tecido em estudo. Este achado, hipoteticamente esperado, vem de encontro às citações de diversos autores que relataram os efeitos anti-proliferativos dos corticosteróides, especialmente os glucocorticóides

(ABREU, 1970; DUJOVNE & AZARNOFF, 1973; GONÇALVES, AGOSTINI & VIZIOLI, 1974 e GREGORI, 1975). Deve-se acrescentar algumas considerações para explicar-se tal efeito, baseadas no mecanismo de ação da droga. Segundo ABREU (1970), os corticosteróides produzem um decréscimo do número de fibroblastos teciduais, evidentemente provocado por alterações do processo de mitose. A diminuição da população fibroblástica redonda na deficiência de síntese de mucopolissacarídeos ácidos. A síntese proteica também é inibida, segundo este autor, devido a droga se ligar a uma proteína plasmática, formando um complexo. Este complexo ligar-se-ia ao núcleo da célula fibroblástica, especificamente à estrutura do DNA, provocando uma inibição da formação do RNA mensageiro, o que interfiriria na síntese de proteínas, no caso presente, na síntese de colágeno.

A curva demonstrada no Gráfico 1, obtida a partir das medidas histofotométricas dos tecidos sob a influência da dexta metasona 21-fosfato, sugere que na fase precoce de proliferação do tecido, a quantidade de MPA livres é mínima, pois os valores percentuais da transmitância de luz são numericamente altos.

São estatisticamente significantes os resultados para os tecidos de granulação aos 7, 14, 21 e 28 dias de evolução, permitindo-se afirmar que a resposta proliferativa foi cronologicamente inibida, quando comparada com os tecidos dos demais grupos.

Com relação ao efeito da fenilbutazona na síntese e maturação do colágeno, encontra-se suporte nas palavras de autores conceituados como GOODMAN & GILMAN (1973) e SCHERRER & WHITEHOUSE (1974), quando afirmam que a fenilbutazona inibe enzimas do Ciclo de Krebs. A conseqüente diminuição da produção de energia tem efeitos diretos sobre a biossíntese de muitas substâncias celulares. Estes autores dizem também, que esta droga é ainda capaz de desdobrar a fosforilação oxidativa e inibir a síntese de MPA (glicosaminoglicanas), pois esta síntese depende de ATP.

Estes conceitos se encaixam de uma maneira coerente aos resultados obtidos neste trabalho. Ao microscópio óptico, os tecidos pertencentes ao Grupo B, isto é, dos animais injetados com fenilbutazona (20 mg/kg/dia) mostraram-se, especialmente aos 7 e 14 dias de estudo, discretamente inibidos, inibição

esta identificada por um menor número de células e capilares sanguíneos não-formados. Por outro lado, a histofotometria dos tecidos deste grupo comprovou realmente, que a síntese de MPA foi proporcionalmente menor que aquelas constatadas nos Grupos C (animais em condições normais) e A (tratados com tripsina), sendo maior, entretanto, do que aquela detectada no Grupo D (tratados com dexametasona 21-fosfato).

Com base na análise estatística das medidas histofotométricas, pode-se afirmar que, aos 7, 14 e 21 dias de evolução tecidual, a quantidade de MPA livres no tecido sob efeito da fenilbutazona é menor que a contida nos tecidos de animais sob condições normais. Aos 28 dias de evolução do tecido, não encontrou-se um resultado diferencial estatisticamente significativo. A explicação para tal fato é determinada pelo aspecto de que, a esta altura, os MPA encontram-se quase que totalmente incorporados ao colágeno.

Os resultados obtidos com esta droga estão de acordo com aqueles observados por NAKAMURA & SHIMIZU (1975), ou seja, que a fenilbutazona tem a propriedade de inibir a síntese de colágeno e, conseqüentemente, a proliferação do tecido de granulação.

A partir dos resultados obtidos nos estudos histológicos e histofotométricos dos tecidos que estiveram submetidos à influência da tripsina (0,1 mg/kg/dia) e comparando-os com aqueles sob condições normais, pode-se sugerir que a enzima proteolítica estudada na presente pesquisa interfere positivamente no processo de reparação animal, no que diz respeito à síntese de colágeno, seu posterior desenvolvimento e maturação. Nos cortes histológicos corados com H.E., nota-se uma crescente população celular fibroblástica e mesenquimal, grande proliferação de capilares sanguíneos com plena atividade; numa etapa mais avançada, observam-se volumosos feixes de colágenos agregados, bem direcionados, conferindo um aspecto de muita organização ao tecido.

Paralelamente constatou-se, através das leituras histofotométricas, que a quantidade de MPA livre no tecido é proporcionalmente maior do que a do Grupo C (Controle) durante os primeiros 21 dias de evolução. Aos 21 dias, ou seja, na fase de maior síntese de glicosaminoglicanas, a análise estatística

é significativa para suportar a afirmação de que a quantidade de moléculas de MPA livres, nos tecidos de ratos injetados com tripsina é maior do que a existente nos tecidos de animais sob condições normais.

A explicação para tais fenômenos pode ser dada, expondo-se um conceito bastante lógico proposto por MARTIN (1955). Segundo este autor, a tripsina agiria diretamente no local inflamado, contribuindo para a restauração da continuidade biológica, através da lise de depósitos de fibrina e material necrótico. Além disso, participaria do restabelecimento da circulação sanguínea e linfática, conseqüentemente, prevenindo maior dano e morte celular.

Em resumo, fazendo-se uma avaliação global dos efeitos das drogas utilizadas neste experimento e, baseando-se nos resultados obtidos, encontra-se subsídios para a aceitação da indicação terapêutica da dexametasona 21-fosfato e da fenilbutazona em processos inflamatórios nos quais a formação de tecido de granulação torna-se um evento indesejável, como por exemplo, na artrite reumatóide, na gôta e em outras patologias das articulações em geral. Por outro lado, de acordo com a dose, pode-se sugerir a contra-indicação destes mesmos agentes anti-inflamatórios em situações nas quais o tecido de granulação é extremamente importante dentro da seqüência de mecanismos que propiciam a reparação do tecido animal.

A tripsina, ao contrário, estaria indicada justamente quando houver necessidade de uma cura mais rápida, principalmente nas lesões extensas onde uma proliferação de colágeno formando fibrilas, fibras e finalmente feixes de fibras bem direcionadas é de primordial importância, como por exemplo, num processo de reparação pós-extração dentária.

Aliados a estas considerações, encontram-se os efeitos colaterais destas drogas, que obviamente não podem ser desprezados.

São fartos os trabalhos que relatam as complicações clínicas da terapia corticosteróide. Basta citar-se o de DUJOVNE & AZARNOFF (1973), que relatam como efeitos indesejáveis destes medicamentos, o aparecimento ou exacerbação de úlceras pépticas, perfurações intestinais, pancreatites, alterações no metabolismo da glucose e dos lipídios, osteoporose, reações de

hipersensibilidade (desde simples urticárias até anafilaxia) , etc.

Também a idiossincrasia provocada pelo tratamento prolongado com a fenilbutazona não é rara. Os efeitos colaterais se manifestam, segundo GOODMAN & GILMAN (1976), numa incidência de 10 a 45% dos pacientes tratados com este medicamento. As referências desfavoráveis mais frequentemente apresentadas são diarreia, vômito, náusea, euforia, hematúria, erupções cutâneas e até mesmo anemia aplástica e agranulocitose.

Com relação a tripsina, existe uma contra-indicação , absoluta quanto a sua administração por via intravenosa. Segundo MARTIN (1955), quando essa enzima é injetada por esta via, ocorre um aumento do tempo de coagulação e acentuada hipotensão e, em doses elevadas, estados semelhantes ao choque. Ainda de acordo com o mesmo autor, devido à afinidade da tripsina por elementos constituintes do plasma e do soro, pode alterar o sistema imunológico, produzindo sensibilização e ocorrência de idiossincrasias. Talvez por este motivo, SELIGMAN (1955), trabalhando com tripsina por via intramuscular, utilizou-se da concomitante administração por via oral de anti-histamínicos, procurando evitar desta forma, os efeitos indesejáveis. Cumpre-se observar que, na presente pesquisa, alguns animais receberam 0,1 mg/kg durante 28 dias e nenhuma reação de hipersensibilidade foi detectada.

Segundo GREGORI (1974), pelo fato da impossibilidade de se afirmar "a priori" não ter havido contaminação dos tecidos inflamados, a administração terapêutica de enzimas proteolíticas poderia romper, prematuramente, a barreira de fibrina defensiva local, que se tenha estabelecido, facilitando, portanto, uma disseminação sistêmica dos microrganismos aí presentes, levando a quadros clínicos de bacteremia e septicemia. O autor acredita que o uso das enzimas proteolíticas como redutoras do edema pós-cirúrgico, em Odontologia, deva ser sempre acompanhado do uso de drogas quimioterápicas e/ou antibióticas que permitam impedir agressões sistêmicas oriundas de disseminações de processos sépticos locais.

6 - CONCLUSÕES

Baseados na discussão dos resultados, e dentro das condições do presente trabalho, pode-se concluir que:

- 6.1 - A síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas) acompanha, em animais sob condições normais, o mesmo padrão da síntese de colágeno, relativamente ao tempo de evolução requerido, atingindo o máximo por volta dos 14 aos 21 dias, decaindo em seguida, com a organização macromolecular do tecido.
- 6.2 - A dexametasona 21-fosfato, na dose de 0,1 mg/kg/dia, demonstrou ser uma potente inibidora da síntese e maturação do colágeno, quando da proliferação do tecido de granulação, em ratos.
- 6.3 - A fenilbutazona, na dose de 20 mg/kg/dia, possui as mesmas propriedades conferidas a dexametasona 21-fosfato, se bem que em menor grau.
- 6.4 - A tripsina, quando administrada numa dose de 0,1 mg/kg/dia, interfere positivamente na síntese e maturação de colágeno, sendo portanto uma aliada importante dos mecanismos de reparação animal.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, E.M. Reparação alveolar em cães: estudo clínico, radiográfico e histológico em condições normais e sob ação hormonal. Piracicaba, 1970. p. 66-7 (Tese (Doutoramento) F.O.P.)
- BAXTER, J.D. & FORSHAM, P.H. Tissue effects of glucocorticoids. Am. J. Med., 53:573-85, 1972.
- BAZIN, S.; LE LOUS, M.; DELAUNAY, A. Collagen in granulation tissues. Agents Actions, 6: 272-6, 1976.
- _____; PELIETIER, M.; _____. The influence of chemical mediators of acute inflammation on the cells of a subacute inflammation. Agents Actions, 3: 317-21, 1973.
- BENTLEY, J.P. Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. Ann. Surg., 165: 186-91, 1967.
- BODVALL, B. & RAIS, O. Effects of infiltration anaesthesia on the healing of incisions in traumatized and non-traumatized tissues. Acta chir. Scand., 123: 83-91, 1962.
- BREYTENBACH, H.S. An evaluation of the use of streptozyme in surgical removal of the impacted mandibular third molar. Med. Proc., 17: 372-5, 1971.
- COHEN, B.H.; LEWIS, L.A.; RESNIK, S.S. Wound healing: a brief review. Int. J. Derm., 14: 722-6, 1975.
- DAHER, D.R.; HERCOS FILHO, J.; CUNHA PRATA, N.R. O uso da tripsina em amigdalectomias. Hospital, 73: 1929-33, 1968.
- DELAUNAY, A. & BAZIN, S. Reparation du tissue conjonctif. Archs Ophthal., 35: 115-26, 1975.
- DUJOVNE, C.A. & AZARNOFF, D.L. Clinical complications of corticosteroid therapy. Med. Clin. N. Am., 57: 1331-41, 1973.
- DURIGHETTO Jr., A.F.; MATHEUS, G.; MARTINELLI, C. Efeitos da corrente elétrica contínua de baixa intensidade sobre o processo de reparo de feridas cutâneas de ratos. Estudo morfológico. Revta Ass. paul. Cirurg. dent., 32: 316-22, 1978.
- ENGLER, R. & JAYLE, M.F. Glycoprotéines plasmatiques et processus granulomateux. Annls Anat. path., 21: 45-58, 1976.

- GONÇALVES, S.H.C.; AGOSTINI, M.L.; VIZIOLI, M.R. "Tecido de Granulação do rato: estudo histoquímico e histológico sob condições normais e sob ação hormonal". Bol. Fac. Odont. Piracicaba nº 74, pg. 1 a 8, 1974.
- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. p.314-16, 920, 1491-514.
- GREGORI, C. Fundamentos e normas para a utilização de drogas antiinflamatórias no âmbito da cirurgia odontológica. Ars Curandi Odont, 1(4):26-29, 1974; 1(5):43-51, 1974; 1(6):42-45, 1975; 2(1):33-36, 1975; 2(2):43-46, 1975.
- GRELLET, M. & SOUSSALINE, M. Action des corticoestéroïdes sur la cicatrisation cutanée. Utilisation en chirurgie maxillo-faciale. Revue Stomat., 76:379-83, 1975.
- HEUGHAN, C. & HUNT, T.K. Some aspects of wound healing research: a review. Can. J. Surg., 18:118-25, 1975.
- HOOPS, H.C. Patologia. 2 ed. México, Interamericana, 1966. p. 244-7; 302-14.
- IM, M.J.C.; FRESHWATER, M.F.; HOOPES, J.E. Enzyme activities in granulation tissue: energy for collagen synthesis, J. surg. Res., 20:121-5, 1976.
- INNERFIELD, I.; ANGRIST, A. SCHWARZ, A. Parenteral administration of trypsin: Clinical effect in 538 patients. J. Am. med. Ass., 152:597, 1953.
- LECHAT, P. Chimie et pharmacologie des glucocorticostéroïdes. Revue Stomat., 76:353-61, 1975.
- LISON, L. Histochimie et cytochimie animales: principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1960. v.1, p. 280-1.
- Mc MINN, R.M.H. & PRITCHARD, J.J. Tissue repair. London, Academic Press, 1969. p. 14-40.
- MADDEN, J.W. & PEACOCK Jr., E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. Surgery, 64: 288-94, 1968.
- MARTIN, G.J. Trypsin, Pharmacology of drug. Exper. Med.Surg., 13: 156, 1955.

- MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M.F. Inflamação. (Prog. Nacional de Atualização) S.L.p., Médica Fontoura Wyeth, 1978.
- NAKAMURA, H. & SHIMIZU, M. Effect of anti-inflammatory agents on accelerated granuloma formation in rats. Chem.pharm.Bull, 23: 1446-51, 1975.
- PEARSE, A.G.E. Histochemistry. Theoretical and Applied. 3 ed. London, Churchill, 1968- v.1, p. 331.
- ROSS, R. The fibroblast and wound repair. Biol.Rev.,43:51-96, 1968.
- SCHERRER, R.A. & WHITEHOUSE, M.W. Antiinflammatory agents: chemistry and pharmacology. New York, Academic Press,1974,v.2, p. 304-24; 369-75.
- SCHILLING, J.A. Wound healing. Surg. Clins N. Am.,56: 859-73, 1976.
- SELIGMAN, B. Trypsin: on anti-inflammatory agent. Separata de Angiology, 6(3): 1955.
- SPERLI, A.E.; SAWADA,M.; CHVINDELMAN, D. O uso da tripsina em cirurgia plástica. Hospital, 72: 1055-87, 1967.
- _____ & _____ et alii. Estudo experimental sobre retas thos tegumentares em cirurgia plástica. Jorn.bras.Med., 15: 135-54, 1968.
- SPIEGEL, L.H. Proteolytic enzymes (intramuscular and topical) an aid in treatment of refractory dry sockets (localized acute alveolar osteomyelitis). Oral Surg., 11: 692-6, 1958.
- VELASCO, M. & GUAITERO, E. A comparative study of some anti-inflammatory drugs in wound healing of the rat. Experientia, 29: 1250-1, 1973.
- VIZIOLI, M.R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 85: 368-77, 1973.
- _____ Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975. (Tese (Docência Livre) - F.O.P.) 65 pgs.
- _____ ; BLUMEN, G.; EL-GUINDY, M.M. Granulation tissue: His^ttophotometric and radioautographic observations on glycosaminoglycans and collagen synthesis and their relation with alkaline phosphatase. Annls Histochem.,21: 237-45, 1976.

VIZIOLI, M.R.; BOZZO, L.; VALDRIGHI, L. Alkaline phosphatase activity and the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 83: 60-9, 1972.

WOESSNER Jr., J.F. & BOUCEK, R.J. Connective tissue development in subcutaneously implanted polyvinyl sponge. Archs Biochem. Biophys., 93: 85-94, 1961.

RESUMO

O presente trabalho teve como uma de suas finalidades, acompanhar a síntese de colágeno e glicosaminoglicanas (M.P.A.) no tecido de granulação, induzido artificialmente em ratos, desde uma fase precoce até sua maturação. Por outro lado, objetivou-se estudar os efeitos de drogas antiinflamatórias, com princípios ativos diferentes, na evolução deste mesmo tecido, comparando-a com aquela observada em animais sob condições normais.

Os resultados obtidos demonstraram que a dexametasona 21-fosfato, na dose de 0,1 mg/kg/dia é uma potente inibidora da síntese de mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas), e de colágeno, o mesmo acontecendo com a fenilbutazona (20 mg/kg/dia), esta porém, inibindo a síntese de glicosaminoglicanas e colágeno em menor grau. Paralelamente, a tripsina (0,1 mg/kg/dia) interfiriu na proliferação do tecido de granulação de uma maneira positiva, tanto quantitativa como qualitativamente.

A partir desses resultados, pôde-se concluir que o antiinflamatório esteróide (dexametasona 21-fosfato), assim como o não esteróide e não enzimático (fenilbutazona), nas doses administradas constituem-se em grandes recursos terapêuticos quando houver necessidade de uma inibição da proliferação do tecido de granulação. Ao contrário, o antiinflamatório enzimático (tripsina) estaria justamente indicado em patologias nas quais uma síntese mais rápida e organizada do tecido de granulação fosse de primordial importância.

SUMMARY

This work had the purpose to follow up the synthesis of collagen and glicosaminoglycanas artificially-induced granulation tissue in rats, since an early phase till the maturation of this tissue. It were also studied the effects of anti-inflammatory drugs with different active principles upon the evolution of granulation tissue, and a comparison was made with the dynamics of normal granulation tissue.

The results have showed that dexamethasone-21-phosphate, in doses of 0,1 mg/kg/day is a powerfull inhibitory action upon the glycosaminoglycans (acid mucopolysacharides) and collagen synthesis, the same happening in relation to phenylbutazone (20 mg/kg/day), with the difference that phenylbutazone as a smaller inhibitory effect. Trypsin (0,1 mg/kg/day) has showed an action of accelaration of the maturation of granulation tissue.

From these results, it was concluded that the steroid antiinflammatory (dexamethasone-21-phosphate), as well as non-steroid and non-enzimatic agent (phenylbutazone) in the used doses are of great therapeutic value when the inhibition of granulation process is needed. Contrarily, the enzymatic anti-inflammatory drug (trypsin) could be indicated in situations when a faster synthesis of granulation tissue was recommended.

APÊNDICE

LEITURAS HISTOFOTOMÉTRICAS

TECIDO DE GRANULAÇÃO - 07 DIAS										
GRUPOS	A		B		C		D			
DROGAS	tripsina		fenilbuta- zona		controle		dexametasona 21 - fosfato			
nº leiturás	laminas		1	2	1	2	1	2	1	2
1	76,0	80,1	84,3	83,8	80,7	79,3	90,3	88,9		
2	79,7	79,4	80,2	82,9	82,5	80,2	87,8	90,3		
3	72,1	79,7	89,3	83,1	80,7	80,3	89,6	89,7		
4	75,2	76,2	87,8	82,7	80,9	79,7	89,1	89,5		
5	70,7	76,8	85,4	82,5	81,1	78,7	90,9	89,9		
6	77,0	77,0	83,5	84,8	82,3	78,8	90,6	90,1		
7	78,6	76,7	85,7	85,9	76,8	79,6	89,6	90,1		
8	78,9	75,4	83,6	85,2	77,3	80,8	89,0	88,5		
9	77,9	79,2	85,3	86,4	81,5	80,4	87,7	88,7		
10	76,2	79,8	88,1	87,2	80,5	80,1	88,5	89,4		
11	79,4	81,0	83,1	84,5	80,3	81,4	87,1	89,7		
12	84,2	80,4	84,5	86,2	81,7	81,3	87,6	88,8		
13	85,1	80,6	86,4	85,7	80,1	80,7	89,2	89,1		
14	77,4	79,9	87,4	87,0	82,3	80,9	89,0	89,5		
15	83,4	79,7	85,9	86,9	79,4	82,1	89,1	91,2		
16	81,9	78,8	83,0	86,9	80,8	81,4	88,5	92,4		
17	82,4	80,2	86,6	85,2	80,5	79,8	89,5	91,7		
18	82,1	80,0	81,8	85,5	82,4	80,3	87,6	92,1		
19	80,3	81,2	84,7	84,9	81,2	80,0	89,8	93,0		
20	77,8	80,4	84,9	85,0	78,5	81,2	88,8	92,6		
21	76,1	79,7	83,0	85,1	78,7	78,9	87,9	90,9		
22	80,1	78,2	82,0	86,2	79,9	78,8	89,5	89,9		
23	78,2	78,5	87,1	86,4	81,3	79,1	88,7	91,0		
24	81,0	77,9	88,2	85,9	76,9	80,4	87,1	90,2		
25	77,9	79,4	82,2	86,0	80,0	79,7	89,9	89,6		
26	73,7	79,5	85,7	83,9	79,8	79,8	85,2	90,3		
27	76,6	79,8	86,6	84,2	78,6	81,0	91,2	89,8		
28	73,8	78,8	80,4	84,7	80,6	80,2	90,8	90,0		
29	73,6	79,1	80,7	85,1	80,5	79,6	89,7	90,4		
30	79,2	78,3	82,1	85,2	79,9	79,5	91,4	90,1		
MEDIA	78,2	79,0	84,6	85,2	79,9	79,5	91,4	90,1		
MEDIA GERAL	78,6		84,9		80,1		89,6			

LEITURAS HISTOFOTOMÉTRICAS

TECIDO DE GRANULAÇÃO - 14 DIAS									
GRUPOS		A		B		C		D	
DROGAS		tripsina		fenilbuta- zona		controle		dexametasona 21 - fosfato	
nº	lâminas	1	2	1	2	1	2	1	2
leituradas									
1		71,3	74,2	80,2	82,2	78,7	73,3	90,4	92,6
2		78,1	73,8	81,6	81,7	71,3	73,8	91,2	89,2
3		72,6	73,7	82,1	81,4	74,3	72,9	91,5	89,9
4		78,5	74,0	82,6	82,1	71,7	72,5	90,9	88,3
5		74,6	73,4	82,5	81,5	77,0	72,5	90,7	84,8
6		75,8	73,2	83,0	80,9	75,4	71,9	90,3	93,8
7		74,0	73,9	80,1	80,3	78,8	72,2	89,8	92,5
8		73,9	72,7	83,9	80,5	81,3	74,2	89,8	91,1
9		71,9	72,1	82,4	81,6	75,6	75,1	90,5	92,8
10		73,2	73,6	82,1	80,4	80,0	76,8	91,3	92,4
11		73,3	74,1	81,4	81,3	81,1	75,9	92,0	87,4
12		75,4	74,2	81,6	80,6	79,3	76,7	91,7	85,2
13		72,0	74,8	83,2	84,1	75,9	77,0	92,1	87,9
14		70,9	72,9	82,4	83,2	79,7	76,6	93,0	87,3
15		71,1	72,5	81,6	82,2	77,0	75,8	92,8	94,1
16		71,5	72,8	82,0	81,7	80,2	75,2	92,5	84,6
17		72,1	73,2	81,8	83,0	76,0	74,9	92,6	85,9
18		70,9	72,9	81,1	82,2	73,7	75,1	92,1	90,7
19		72,0	72,0	81,2	81,7	78,6	74,8	91,8	91,6
20		70,0	72,7	81,4	81,1	76,9	74,4	91,4	85,2
21		73,4	74,0	80,9	80,9	72,2	73,9	90,5	89,4
22		72,2	73,1	81,7	79,8	74,1	74,0	91,1	91,1
23		70,4	72,6	81,3	78,8	77,1	73,7	91,7	90,2
24		69,8	72,8	81,3	80,1	76,5	76,1	91,0	86,2
25		69,4	71,5	80,7	81,2	70,9	75,9	90,6	89,4
26		71,0	70,6	82,0	81,4	74,8	75,6	90,5	91,7
27		71,0	70,3	81,8	82,0	77,3	74,0	89,9	89,7
28		74,1	69,9	82,1	81,9	76,9	72,8	88,7	89,3
29		72,0	70,1	81,4	80,7	79,3	72,0	88,7	93,0
30		71,7	70,7	81,7	82,0	77,7	71,2	87,8	90,3
MÉDIA		72,6	72,7	81,7	81,4	76,7	74,3	90,9	89,2
MÉDIA GERAL		72,6		81,5		75,5		90,0	

LEITURAS HSITOFOTOMÉTRICAS
TECIDO DE GRANULAÇÃO - 21 DIAS

GRUPOS		A		B		C		D	
DROGAS		tripsina		fenilbuta- zona		controle		dexametasona 21 - fosfato	
nº leituras	lâminas	1	2	1	2	1	2	1	2
		1		72,5	69,8	81,6	80,9	73,1	72,7
2		65,6	69,4	79,8	80,4	73,8	72,1	91,2	91,0
3		59,3	70,1	80,2	81,2	73,0	71,8	92,9	90,8
4		62,7	71,1	80,5	81,0	72,9	71,8	95,6	90,7
5		65,5	71,2	76,2	80,4	71,7	71,7	88,2	91,2
6		61,5	70,5	77,3	81,0	70,7	72,0	92,6	94,4
7		73,7	70,3	77,0	79,7	70,1	72,4	91,9	89,6
8		67,7	69,7	76,5	78,8	70,1	74,3	90,5	89,8
9		72,7	68,7	76,7	79,3	69,8	75,2	91,7	88,4
10		67,2	69,0	75,8	77,6	73,0	75,5	89,0	87,9
11		69,0	69,4	75,1	76,6	74,5	74,6	92,7	89,2
12		67,0	68,2	80,6	78,1	74,1	74,1	89,1	90,1
13		67,4	69,7	81,0	77,7	73,6	73,4	92,9	92,4
14		70,6	70,2	80,7	77,0	75,4	72,9	89,2	91,7
15		67,8	71,0	81,7	76,6	74,5	71,6	89,9	90,8
16		66,9	70,4	80,7	78,3	72,0	71,2	89,7	89,7
17		63,7	69,8	79,6	79,1	73,6	70,8	89,8	89,7
18		70,7	70,2	78,4	80,2	71,5	70,4	90,8	88,9
19		70,7	69,7	79,0	79,8	71,7	70,5	88,8	89,0
20		71,5	70,0	77,8	78,9	72,7	70,6	89,5	90,1
21		71,7	71,1	77,9	77,8	74,0	70,5	91,7	91,2
22		72,0	71,4	79,6	78,5	71,1	71,2	89,3	90,4
23		63,8	72,1	80,2	80,0	79,5	71,1	84,9	91,2
24		74,5	69,9	79,8	81,1	69,8	71,1	85,2	89,9
25		74,2	67,9	77,4	79,7	69,0	70,4	87,0	89,5
26		54,8	68,3	78,4	78,4	69,9	72,6	84,8	89,6
27		63,1	68,5	79,1	78,5	68,7	73,1	86,8	87,8
28		66,9	67,2	79,5	77,9	70,1	74,5	87,7	88,0
29		71,9	67,8	77,8	78,3	73,5	73,2	85,8	88,2
30		71,1	68,4	77,3	79,2	73,8	72,0	88,0	89,1
MÉDIA		70,34	69,7	78,77	79,06	72,07	72,31	89,56	89,92
MÉDIA GERAL		70,0		78,9		72,1		89,7	

LEITURAS HISTOFOTOMÉTRICAS

TECIDO DE GRANULAÇÃO - 28 DIAS									
GRUPOS	A		B		C		D		
DROGAS	tripsina		fenilbuta- zona		controle		dexametasona 21 - fosfato		
nº leitur	lâminas								
	1	2	1	2	1	2	1	2	
1	78,0	77,4	82,3	78,7	78,3	78,0	88,1	84,2	
2	74,1	78,3	77,1	79,1	77,7	79,2	85,8	85,6	
3	74,5	76,7	72,3	78,4	79,1	79,1	86,4	83,9	
4	78,2	76,1	76,1	80,2	80,5	78,4	85,7	84,1	
5	77,3	76,8	82,8	81,4	81,2	80,1	87,0	85,2	
6	78,8	78,1	85,1	81,5	79,3	81,0	88,4	84,4	
7	72,5	78,6	74,9	80,7	78,4	80,5	89,2	83,9	
8	73,6	78,3	80,7	80,1	79,7	79,6	87,9	83,7	
9	74,8	78,4	74,8	81,2	79,3	79,4	89,5	84,0	
10	74,7	79,6	84,2	79,4	78,6	79,7	87,2	84,2	
11	79,3	77,2	86,1	79,6	80,2	78,8	87,5	84,1	
12	78,4	77,5	80,9	78,8	81,4	78,4	85,9	83,2	
13	75,2	76,6	80,9	79,2	79,9	77,3	84,7	82,9	
14	77,4	76,9	79,6	80,0	79,7	77,5	87,7	81,9	
15	76,0	76,8	82,1	82,0	80,3	75,0	86,0	82,0	
16	75,9	75,3	79,7	82,5	76,2	76,4	83,4	82,2	
17	78,0	75,8	82,7	82,4	77,2	76,9	85,5	81,5	
18	76,2	77,0	83,3	82,5	78,5	77,2	80,0	81,5	
19	73,5	77,1	77,5	81,7	78,8	78,1	87,0	81,7	
20	70,2	74,4	77,9	81,6	79,0	80,3	84,2	83,6	
21	75,2	75,4	77,4	80,3	77,8	79,7	90,1	82,2	
22	79,2	75,9	76,4	79,9	79,6	78,9	89,4	82,0	
23	74,8	74,8	76,4	80,2	80,4	80,2	87,8	81,6	
24	73,0	76,2	78,5	81,0	79,9	80,5	85,4	83,2	
25	75,3	76,7	79,2	78,7	78,0	79,7	88,4	83,4	
26	75,5	77,1	78,8	78,5	80,7	78,6	88,1	84,0	
27	74,3	77,0	82,9	79,4	78,6	77,5	87,8	84,1	
28	70,4	75,4	82,8	79,3	80,2	80,1	84,6	83,2	
29	75,2	74,3	80,5	79,3	79,7	78,9	86,8	83,7	
30	70,6	72,9	83,1	79,6	78,5	78,3	88,3	82,9	
MÉDIA	75,34	76,62	79,9	80,24	79,22	78,87	86,79	83,27	
MÉDIA GERAL	75,9		80,1		79,0		85,0		