

LUÍS CARLOS SPOLIDORIO

EFEITO DA CICLOSPORINA SOBRE O PROCESSO DE
REPARO EM TECIDO CUTÂNEO DE RATO.

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
conforme resoluções*

CCPG/036/83

*Piracicaba, 4 de dezem-
bro de 1991*

M. R. L. L. L.

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia e
Patologia Buco-Dental (área
Patologia) da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Cam-
pinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Piracicaba - S.P.

- 1991 -

Sp65e

15284/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

LUÍS CARLOS SPOLIDORIO ⁱⁿ

EFEITO DA CICLOSPORINA SOBRE O PROCESSO DE
REPARO EM TECIDO CUTÂNEO DE RATO.

Orientador: Prof. Dr. MARIO ROBERTO VIZIOLI ⁺

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia e
Patologia Buco-Dental (área
Patologia) da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Cam
pinas, para obtenção do títu
lo de Mestre em Ciências

Piracicaba - S.P.

- 1991 -

À meus pais e minha irmã, que
com trabalho, paciência e
amor, doaram parte de suas
vidas por mim e me ensinaram
que sonhar e crer, é na
verdade realidade futura.

À Denise e a meu filho, que
ainda no ventre, me orientam
com amor, a ser paciente na es
perança daquilo que poderemos
tornar-nos juntos. Vos amo.

Ao Professor Doutor MÁRIO ROBERTO VIZIOLI, pela orientação, e segurança na transmissão de seus conhecimentos e experiência, assim como no exemplo de integridade científica.

ÍNDICE

I-	INTRODUÇÃO.....	02
II-	REVISÃO DE LITERATURA	
II.1-	TECIDO DE GRANULAÇÃO.....	04
II.2-	LINFÓCITOS E RESPOSTA DA IMUNIDADE CELULAR.....	06
II.3-	IMUNOSSUPRESSÃO.....	09
III-	PROPOSIÇÃO.....	18
IV-	MATERIAL E MÉTODOS	
IV.1-	AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE AO DNCB.....	20
IV.2-	EFEITO DA CICLOSPORINA NA REAÇÃO DE HIPERSENSIBI- LIDADE AO DNCB.....	21
IV.3-	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	22
IV.4-	PROCESSO DE REPARO DO TECIDO CUTÂNEO DE RATOS NORMAIS E TRATADOS COM CICLOSPORINA.....	23
V-	RESULTADOS	
V.1-	AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE AO DNCB.....	26
V.2-	EFEITO DA CICLOSPORINA NA REAÇÃO DE HIPERSENSIBI- LIDADE AO DNCB.....	27
V.3-	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	28
V.4-	PROCESSO DE REPARO DO TECIDO CUTÂNEO DE RATOS NORMAIS E TRATADOS COM CICLOSPORINA.....	29
V.5-	MEDIDAS HISTOFOTOMÉTRICAS.....	33

VI-	DISCUSSÃO.....	45
VII-	CONCLUSÕES.....	51
VIII-	RESUMO E SUMMARY.....	53
IX-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
X-	APÊNDICE.....	67

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

O processo de reparo pode ser modificado por fatores sistêmicos ou locais, que aceleram ou retardam o seu desenvolvimento. Deste ponto de vista, vários fármacos têm sido considerados como de mais alta importância, destacando-se entre eles os corticosteróides, os antimetabólicos e os anticoagulantes (REED et al., 1985; PESSA et al., 1987).

Vários trabalhos têm mostrado a influência do sistema imunológico sobre o processo de reparo (JOHNSON et al., 1976; WAHL et al., 1978), e sabe-se que drogas imunossupressoras, como metilprednisolona, glicocorticóides e azatioprina alteram de maneira expressiva o processo de reparo (NEHLANDER et al., 1983; EISINGER et al., 1985). A ciclosporina é um dos imunossupressores mais recentes e mais usados na clínica médica, particularmente em transplantes de órgãos (WISKOTT, 1983; MIHATSCH et al., 1986). Também é usada no tratamento da psoríase, artrite reumatóide, síndrome de Behcet, lupus eritematoso sistêmico, hepatite crônica (WILKE et al., 1990). Entretanto, o papel da ciclosporina no processo de reparo ainda não é muito explorado, sendo poucos os trabalhos de alguma forma relacionados a esse aspecto.

II - REVISÃO DA LITERATURA

II.1 - TECIDO DE GRANULAÇÃO

A inflamação é bem definida como a reação local do tecido vascularizado às agressões, sendo portanto um processo homeostático de defesa do organismo ofendido. Independente da natureza do agente agressor, a resposta inflamatória é sempre iniciada pela liberação de mediadores químicos, os quais, entre outras ações, promovem o aumento da permeabilidade vascular e, desta forma, a passagem de líquidos e células do sangue para o espaço intersticial. Esse processo de exsudação tem por objetivo destruir ou neutralizar os agentes agressores e, ainda, favorecer a reparação tecidual consequente à agressão.

A reparação inicia-se com a proliferação de fibroblastos e a multiplicação de pequenos vasos sanguíneos a partir de mitoses de células endoteliais.

A proliferação celular invade o exsudato que é reabsorvido, produzindo uma massa avermelhada, altamente vascularizada, que recebe o nome de tecido de granulação, que pode ser induzido através de técnicas distintas, e tem sido usado como modelo experimental em pesquisas dos mais diversos aspectos ligados à gênese e evolução dos processos de cura do organismo animal. Dentre esses estudos, a síntese, a maturação e o desenvolvimento das fibras de colágeno foram bastante estudados, objetivando-se o conhecimento da morfologia do

colágeno, sua cronologia de síntese, bem como os aspectos bioquímicos e fisiológicos dos componentes estruturais que participam do tecido de granulação (**VIZIOLI**, 1973; **COHEN** et al, 1975; **VIZIOLI**, 1975; **BAZIN** et al., 1976).

Em condições normais, a síntese de fibras colágenas no processo de reparação tem início ao redor do 4º dia de maturação, atingindo seu grau máximo de desenvolvimento entre 15 a 20 dias e, posteriormente, decai progressivamente.

As etapas iniciais do processo de síntese de colágeno ocorrem intracelularmente, mais especificamente nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso dos fibroblastos secretores. O material produzido é então transferido para as vesículas do aparelho de Golgi ou diretamente para o espaço celular como moléculas de protocolágeno, onde agrega-se pela polimerização que ocorre, formando fibrilas de colágeno.

Por outro lado, a substância fundamental amorfa, formada principalmente por glicosaminoglicanas, é indispensável ao processo de agregação de fibrilas de colágeno, funcionando como substância cimentante, no sentido de formar fibras e feixes de fibras.

Segundo **DUNPHY** (1955), **BENTLEY** (1967) e posteriormente **VIZIOLI** (1975), o conteúdo de glicosaminoglicanas livres no tecido de granulação é grande até o 15º dia após o início do processo; posteriormente a esse período, a quantidade decresce, mostrando que a síntese dessas substâncias é ativa durante aproximadamente 15 dias, agregando os feixes de

colágeno e, conseqüentemente, contribuindo para a maturação final do tecido.

Dentre as células inflamatórias que participam do processo de cicatrização, a que mais se destaca no estudo da imunossupressão pela ciclosporina é a linhagem dos linfócitos T pela sua participação na resposta imune celular e ser célula alvo na ação dessa droga.

II 2 - LINFÓCITOS E RESPOSTA DA IMUNIDADE CELULAR

Dentro da linhagem linfocítica, dependendo do órgão linfóide primário onde ocorra a maturação, originar-se-ão linfócitos T ou B, as principais células efetoras da resposta imune.

Os linfócitos diferenciados no timo são denominados linfócitos timodependentes ou linfócitos T. Os linfócitos T ativados secretam uma série de substâncias biologicamente ativas, denominadas linfocinas, algumas das quais responsáveis pelas reações de hipersensibilidade tardia, pelas reações de enxertos e pela imunidade a tumores.

Os pequenos linfócitos, distribuídos pelos compartimentos representados nos mamíferos pelo timo, órgãos linfóides peri-

féricos e pelo conjunto de linfócitos circulantes, constituem na verdade, uma população heterogênea, muito embora os linfócitos T sejam predominantes.

Segundo **GOODMAN** et al. (1987), histologicamente a fase mais primitiva da resposta da imunidade celular é observada como um agregado perivascular com células mononucleares, seguida por uma exsudação mais extensa de células mono e polimorfonucleares. Estas últimas logo migram para longe da lesão, deixando atrás de si um infiltrado celular predominantemente mononuclear que consiste de linfócitos e macrófagos.

FISHER et al. (1965) avaliaram o efeito da timectomia em ratos recém-nascidos, verificando que histologicamente a timectomia não afetava o desenvolvimento do tecido de granulação. Concluíram assim, que os linfócitos timo dependentes não influenciavam na resposta inflamatória.

Entretanto, **JOHNSON** et al. (1976) relataram que quando fibroblastos "in-vitro" são submetidos à ação das linfocinas, aumentam em número, assim como aumenta a produção de fibras colágenas, mostrando que os linfócitos T, especialmente as suas linfocinas, tem um importante papel no desenvolvimento e cronologia do tecido de granulação.

OLUWASANMI et al. (1976) propuseram-se a estudar o efeito da resposta imune celular em granulomas induzidos pela implantação de esponja de PVC através da imunização com albumina sérica bovina e com dinitroclorobenzeno (DNCB). Os autores

observaram que a imunoestimulação aumentava o número de linfócitos e afetava a atividade fibroblástica, estimulando a síntese de colágeno.

Também WAHL et al. (1978) mostraram que a resposta imune celular tem um importante papel no processo de reparo; os linfócitos T, participam nesse processo no aumento da migração de fibroblastos na área da ferida, assim como na estimulação da síntese de colágeno.

BARBUL et al. (1982) através de implantes de esponjas de P.V.C., induziram experimentalmente tecido de granulação no dorso de ratos, e avaliaram efeito da timectomia sobre o desenvolvimento do tecido de granulação. Os autores concluíram que a timectomia retardou a maturação e a colagenização do granuloma, demonstrando que o timo, mais especificamente os linfócitos T, e a resposta imune celular são ativos no sítio do sistema de reparo.

BARBUL et al. (1989) relataram que o linfócito T supressor tem efeito inibitório no tecido de reparo, enquanto o linfócito T helper não altera a maturação da síntese de colágeno.

II.3 - IMUNOSSUPRESSÃO

A imunossupressão consiste no estado de incapacitação do sistema imunológico, e pode ser produzida através de vários métodos, como por exemplo, a drenagem do ducto torácico, timectomia ou esplenectomia. Também pode ser produzida através da administração de drogas, como a azatioprina associada a corticóide, metilprednisolona e a ciclosporina.

Em transplantes de órgãos de um modo geral, as medidas imunossupressoras procuram inibir as células imunocompetentes ativadas, tornando possível a tolerância ao órgão de um doador estranho e a preservação de sua função no organismo receptor.

Segundo **CARPENTER** et al. (1980), quando existem diferenças de histocompatibilidade entre doador e receptor, é necessário modificar ou suprimir a resposta imune, para que o receptor seja capaz de aceitar o enxerto.

Segundo **ROITT** et al. (1989), um dos esquemas terapêuticos mais utilizados para suprimir a resposta imune é a administração de um corticóide associado a um fármaco antimetabólico, mas o problema que surge com esta medida é que o indivíduo torna-se mais susceptível à infecção.

Já **KAHAN** (1985-b) argumentou que dos vários métodos usados para induzir a imunossupressão, nenhum até o momento conseguiu uma modulação seletiva da resposta imune contra

antígenos de histocompatibilidade do doador de órgãos. A descoberta da ciclosporina representa um dos progressos mais recente na área dos transplantes.

GOTO et al. (1987), apresentam um outro agente imunossupressor, o FK506, que é um antibiótico derivado da fermentação de Streptomyces tsukubaensis, e é um dos fármacos de última geração, que tem um mecanismo de ação similar à da ciclosporina e que tentará de maneira ideal, suprimir a resposta imunológica, sem causar efeitos colaterais. **WASIK** et al. (1991), relatam que esse fármaco diminui o potencial citotóxico, como a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em comparação a ciclosporina.

Já **PLATZ** et al. (1991) descrevem o mais novo agente imunossupressor o RS-61443, derivado do ácido micofenólico, que administrado em 33 cães submetidos a transplantes renais, apresentaram uma ótima recuperação, prolongando a sobrevivência do enxerto, de uma maneira positiva em comparação com a ciclosporina. Em cães que receberam o RS-61443 por longo tempo (150 dias), não foram acometidos por nefrotoxicidade, hematotoxicidade ou hepatotoxicidade, mas sintomas gastrointestinais como gastrite e diarreia foi diagnosticado.

A administração de azatioprina associada a corticóides é ainda bastante utilizada na imunossupressão. Os reagentes biológicos como a globulina antilinfocitária e os anticorpos monoclonais anti-linfócitos T são métodos mais avançados que estão ainda em fase de experimentação.

A maioria dos agentes imunossupressores exibem falta de especificidade, causando depressão no sistema de defesa do organismo e anulando as respostas imunológicas inespecíficas (THOMSON, 1983).

O desenvolvimento da ciclosporina iniciou-se por volta de 1970, a partir do isolamento de uma nova linhagem do fungo *Tolypocladium inflatum*, sendo uma substância moduladora que age especificamente no produto dos linfócitos T, causando a supressão da imunidade celular mediada por essas células. Segundo NELSON (1984), foi em 1975 que os pesquisadores conseguiram elucidar a estrutura undecapolipeptídica cíclico, o peso molecular de 1,202.6 e a fórmula química (C₆₂ N₁₁₁ O₁₂) da ciclosporina.

Em 1978 foram executados os primeiros ensaios clínicos em transplantes de rins, mas somente em 1980 os pesquisadores conseguiram obter a síntese total da ciclosporina (TOSATO et al., 1982). A ciclosporina atinge com mais intensidade os linfócitos T helper do que os linfócitos T supressores, resultando uma ação mais enfática a favor da ação imunossupressora (DALEY et al., 1984).

A ciclosporina atua como um fator reversível da função dos linfócitos T, diminuindo a liberação de linfocinas, especialmente interleucina 2 por essas células (THOMAS et al., 1986).

WAGNER (1983) admitiu que a ciclosporina exerça sua propriedade imunossupressora no interior celular, ligando-se às proteínas citoplasmáticas e nucleares, alterando a decodificação

dos ácidos nucleicos durante a síntese de linfocinas.

Segundo **KALIL** et al. (1988), no citoplasma celular a ciclosporina se fixa a uma proteína (ciclofilina) para entrar no núcleo, onde impede a transcrição de alguns gens específicos, inibindo a produção de interleucina 2 pelo linfócito T helper e o receptor para esta linfocina nos linfócitos T citotóxicos.

No entanto, segundo **CALABRESI** et al. (1987), a ciclosporina exerce pouco efeito sobre a ativação e proliferação dos linfócitos T supressores.

Todas as evidências concordam que o maior efeito da ciclosporina está concentrado no bloqueio dos linfócitos T em produzir interleucina 2. (**NUSSEMBLATT** et al. 1986).

Assim, para **DALEY** et al. (1984) é importante o fato de que doses suficientes para suprimir a função dos linfócitos T não tenham efeito sobre os linfócitos B, deixando o paciente parcialmente imunossuprimido.

GREEN (1981), descreveu que a ciclosporina é o primeiro agente terapêutico capaz de inibir seletivamente a ativação de populações distintas dos linfócitos imunocompetentes, além de atuar interferindo na ação das células sem destruí-las.

Entretanto, **SIDERAS** et al. (1988), avança a hipótese da ciclosporina inibir a produção de um maior número de interleucina, como a IL-2, IL-3, IL-4 e interferon das células T helper.

Segundo **KIMBALL** (1990), a ciclosporina tem ação específica inibindo somente a interleucina 2 das células T

helper.

STEINMULLER (1985), afirmou que a inibição do sistema imune com a ciclosporina é reversível com a interrupção do uso da droga, e não se menciona qualquer efeito citotóxico sobre as células da medula óssea. Essa é, portanto, uma inovação do modelo imunossupressor devido à sua atuação específica sobre o sistema imune. Ela poupa as células indiferenciadas da medula óssea, permitindo que os leucócitos e eritrócitos sejam formados e maturados normalmente.

Vários autores como **TUTSCHKA** et al. (1979), **STARSH** et al (1981), **NIESSEN** et al. (1982) e **CALNE** (1982), avaliaram em animais de laboratório a profilaxia e tratamento da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos com a ciclosporina, prolongando a sobrevivência de transplantes de rim, fígado e coração.

Segundo **PTACHCINSKI** et al. (1985), a administração oral e endovenosa da ciclosporina visando a profilaxia da rejeição de transplante de rim, fígado e coração no ser humano, tem eficácia cientificamente comprovada e **KALIL** et al. (1988) descreveram que a ciclosporina é responsável pelo aumento da taxa de sobrevida de pacientes que receberam transplantes.

Segundo **THOMAS** et al. (1986), foram descritas outras propriedades farmacológicas da ciclosporina como atividades anti-viral, anti-tumoral e anti-parasitária, embora estas ainda não tenham sido reconhecidas pelos órgãos oficiais.

KANITAKIS et al. (1990), descrevem que em recentes resultados obtidos em pesquisas "in vitro" e "in vivo", há

evidências que a ciclosporina pode manifestar efeito direto no crescimento de células epiteliais, assim como também estimulando folículos pilosos.

BOTTCHER et al. (1990), induziram inflamação em pleura de ratos através da carregenina, e administraram 5mg/Kg/dia de ciclosporina, verificando que houve diminuição da porcentagem do número de células inflamatórias, assim como do nível de prostaglandinas e leucotrienos na fase aguda da inflamação.

NENLANDER et al. (1983) e **AHONEM** et al. (1983), compararam o efeito da ciclosporina e da metilprednisolona na reação inflamatória e na formação do tecido de granulação, em ratos que foram submetidos a implantes de esponjas de P.V.C., e verificaram que a metilprednisolona retarda a evolução do tecido de granulação, enquanto o mesmo efeito não foi observado com a ciclosporina. Também a comparação do efeito da ciclosporina com a azatioprina mostra que a azatioprina prejudica a cronologia do tecido de granulação, não se observando o mesmo com a ciclosporina (**EISINGER** et al., 1985; **RYFFEL**, 1989).

Quanto à reparação óssea, **WARREN** et al. (1985) comprovaram a eficácia da ciclosporina, quando submeteram ratos imunossuprimidos por essa droga à fratura femural, e verificaram que a evolução da reparação teve uma cronologia normal.

Já **FISHEL** (1983), estudou o desenvolvimento do tecido de granulação, através do implante de esponja de P.V.C. em ratos imunossuprimidos pela ciclosporina na dose de 125 mg/kg/10 dias e verificou que houve atraso na cronologia do

desenvolvimento do granuloma e consequente fibrosamento.

Segundo **BOREL** et al. (1983), a ciclosporina pode provocar efeitos secundários, apesar de sua potência inquestionável e do menor índice de complicações infecciosas. A nefrotoxicidade é a complicação mais frequente e clinicamente mais importante após o tratamento com ciclosporina (**COHEN** et al. 1984). De acordo com **RIED** et al. (1983), outros efeitos secundários documentados incluem: hipertensão, tremores, hepatotoxicidade e edema facial.

Segundo **THOMSON** et al. (1981), em ratos tratados com diferentes doses de ciclosporina não foram observadas alterações nos índices bioquímicos da urina e na quantidade total e parcial da série branca e vermelha do sangue.

A administração endovenosa de 12 mg/kg/dia de ciclosporina em carneiro, num período de 5 dias, produz hipertensão, podendo de forma direta inviabilizar transplantes renais (**TRESHAN** et al. 1990; **SHINOZAWA** et al. (1990), demonstraram que doses de 7 mg/kg/dia de ciclosporina por período de 70 e 140 dias, provocaram involução medular, danos nos corpúsculos de Hassal e modesta involução do córtex do timo.

Quanto à epidemiologia, **VATHSALA** et al. (1990) descrevem que de 704 pacientes que submeteram-se a transplantes renais e foram imunossuprimidos por longo tempo com ciclosporina, 12,8% apresentaram proteinúria, 30,2% tiveram rejeição crônica do órgão transplantado e 11,1% apresentaram glomerulonefrite.

HUANG et al. (1990) relatam que, de 39 pacientes que se submeteram a transplantes renais, e foram medicados com ciclosporina, 50% desenvolveram hepatite B, 15% desenvolveram cirrose hepática, e 5% descompensação hepática.

SUMRANI et al. (1991) relatam que, entre junho de 1983 e dezembro de 1988, 39 dos 337 pacientes (11,6%), que se submeteram a transplantes renais e foram tratados com ciclosporina, desenvolveram diabetes mellitus, cuja incidência é baixa em relação a pacientes tratados com esteróides.

Portanto, a ciclosporina é uma importante droga imunossupressora, e sua descoberta tem aberto novas perspectivas quanto a transplantes de órgãos e tratamento de outras afecções. Entretanto, estudos adicionais que levem em consideração a razão risco/benefício ainda são necessários.

III - PROPOSICÃO

III - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é o estudo do efeito da ciclosporina sobre o processo de reparo (síntese e evolução do tecido de granulação) de ratos, através da microscopia de luz transmitida comum, da microscopia de polarização e da histofotometria.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV - MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 139 ratos (Rattus norvegicus, Albinus, Wistar) adultos, machos, pesando em média 220 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração "Labina" (Purina) e água "ad libitum".

IV.1 - AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE AO DINITROCLOROBENZENO (DNCB).

Para análise da resposta imunológica dos ratos, usou-se o teste de hipersensibilidade retardada provocado pelo DNCB. 50 ratos, distribuídos em 5 grupos de 10, foram sensibilizados, aplicando-se com uma micropipeta na pele da região abdominal, previamente tricotomizada, 50 μ l da solução de dinitroclorobenzeno a 50 mg/ml, dissolvido em acetona e azeite de oliva na proporção de 1:1. Decorridos 5 dias, a reação de hipersensibilidade foi desencadeada, aplicando-se 5 μ l da solução desencadeante com concentrações crescentes de 10, 20, 30, 50 e 100 mg/ml na superfície da orelha esquerda, nos 5 grupos respectivamente. Um grupo de 10 animais, foi submetido aos mesmos procedimentos, tendo solução de NaCl a 0,9% como

substituto do DNCB, de acordo com **VADAS** et al. (1975), e serviu como controle.

Após 24 horas, os animais foram sacrificados através de inalação de éter etílico, e as orelhas retiradas com o auxílio de uma tesoura curva. A avaliação imunológica foi feita de acordo com **CORSINI** et al. (1979), pela relação dos pesos da orelha que recebeu a dose desencadeante (orelha esquerda) e da orelha normal (orelha direita). Os resultados foram expressos em porcentagem. Se, por exemplo, a orelha esquerda pesou 11,0mg e a direita 10,0mg, a relação será de 10%.

IV.2 - EFEITO DA CICLOSPORINA NA REACÃO DE HIPERSENSIBILIDADE AO DNCB

30 ratos foram distribuídos em 6 grupos de 5 animais, sendo 5 grupos tratados com concentrações crescentes de ciclosporina, 5, 7, 10, 30 e 50mg/kg de peso corporal/dia e 1 grupo controle, que recebeu solução de NaCl 0,9%.

Inicialmente, a ciclosporina (Laboratório Sandoz do Brasil), recebida em ampolas para uso clínico, numa concentração de 50 mg/ml, foi diluída em solução de NaCl a 0,9%, numa concentração final de 10 mg/ml. A ciclosporina foi injetada

intraperitonealmente, diariamente, durante 7 dias, e o grupo controle recebeu a solução fisiológica pelo mesmo período de tempo.

Após 24 horas da primeira injeção intraperitoneal, os animais foram sensibilizados com DNCB, e depois de 5 dias a reação de hipersensibilidade foi desencadeada na orelha esquerda, como descrito anteriormente. A quantificação dos resultados foi feita pela relação dos pesos entre as orelhas com hipersensibilidade (esquerda) e normal (direita), e no 6º dia de aplicação de ciclosporina, foi coletado sangue da veia caudal para contagem total e diferencial de leucócitos.

IV.3 - CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

A contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos foi feita em 2 ratos do grupo controle e 2 de cada grupo tratado com ciclosporina. Após anestesia com éter etílico, foi feita pequena incisão na extremidade da cauda, e a primeira gota de sangue desprezada. A seguir, foram coletadas 3 gotas de sangue, para preparação de 3 lâminas de esfregaço sanguíneo de cada animal de cada grupo. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foram coletados 10 µl de sangue, diluídos imediatamente 20 µl de líquido de Turk. A contagem total de

leucócitos foi feita com o auxílio de câmara de Newbauer e objetiva de 10 x.

A contagem diferencial foi feita em esfregaços corados pela técnica de Leishman, usando-se a objetiva de imersão, sendo contados 100 leucócitos em cada lâmina.

IV.4 -PROCESSO DE REPARO DO TECIDO CUTÂNEO DE RATOS NORMAIS E TRATADOS COM CICLOSPORINA

35 ratos foram distribuídos em 10 grupos, sendo 5 grupos de 5 animais tratados com ciclosporina e 5 grupos de 2 animais-controle, injetados com NaCl a 0,9%. A ciclosporina foi injetada intraperitonealmente, 10 mg/Kg de peso corporal/dia durante 6 dias consecutivos, visto que esta concentração foi a escolhida, segundo resultados dos experimentos descritos anteriormente.

No 7º dia, os animais de todos os grupos foram anestesiados com éter etílico, tricotomizados na região dorsal e, com o auxílio de bisturi número 15, pinça e tesoura de ponta reta, foi feita uma abertura de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm na pele, preservando-se o tecido muscular subjacente. Durante todo o período experimental, os ratos continuaram a receber intraperitonealmente ciclosporina ou NaCl a 0,9%. Os animais

foram sacrificados nos períodos de 4, 10, 17, 21 e 28 dias após a incisão na pele, e a área de reparação retirada e fixada em formol a 10%, durante 48 horas. Os cortes histológicos (7 um de espessura), foram corados com hematoxilina/eosina, impregnação argêntica e azul de toluidina pH4,0 de acordo com LISON (1960).

A presença de glicosaminoglicanas foi detectda nos cortes corados com azul de toluidina, num histofotômetro Zeiss, utilizando-se objetiva de 40 x e luz monocromática de 540 milímicrons, como indicado por PEARSE (1968). Todos os pontos do tecido de granulação foram medidos, num total de 30 valores por lâmina. Os resultados assim obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste T de Student.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

V.1 - AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE AO DENITROCLORDBENZENO (DNCR).

As médias percentuais da relação entre os pesos das orelhas (esquerda/direita) dos grupos de animais que foram submetidos ao testes com DNCR, foram maiores quando comparados ao grupo controle. Verificou-se ainda que, com doses desencadeantes crescentes de DNCR, a relação dos pesos das orelhas tiveram aumento respectivo até à aplicação da dose de 50mg/ml, tendendo a partir dessa dosagem, a permanecer constante. Esses valores podem ser observados na tabela I.

TABELA 1. Médias e desvios padrões percentuais da relação entre os pesos das orelhas (esquerda/direita) de ratos imunizados com DNCR e que receberam crescentes doses desencadeantes da mesma droga

Dose de DNCR mg/ml	Médias em % da relação dos pesos das orelhas esquerda/direita
Zero	0,5 ± 0,3
10	16,4 ± 2,6
20	15,8 ± 2,0
30	17,8 ± 3,0
50	18,9 ± 2,8
100	18,1 ± 2,5

V.2 - EFEITO DA CICLOSPORINA NA REACÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE AO DNCE

Tomando-se por base os dados obtidos na tabela 2, verificou-se que a relação em porcentagem dos pesos das orelhas (esquerda/direita) dos animais tratados com doses crescentes de ciclosporina e submetidos ao teste com DNCE, é menor quando comparado ao grupo controle (zero), indicando que não houve reacção de hipersensibilidade com o referido teste.

TABELA 2 - Médias e desvios padrões percentuais da relação entre os pesos das orelhas esquerda/direita de ratos tratados com diversas concentrações de ciclosporina e ratos-controle, submetidos à imunização pelo DNCE.

Ciclosporina mg/Kg/dia	relação dos pesos das orelhas esquerda/direita
zero	19,6 ± 1,6
5	0,5 ± 0,3
7	0,5 ± 0,1
10	0,3 ± 0,1
30	0,2 ± 0,2
50	*

* Os animais tratados com 50 mg/Kg/dia de ciclosporina morreram depois do 3º dia do tratamento, impossibilitando a avaliação.

V.3 - CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Analisando-se a Tabela III, observa-se que os animais tratados com ciclosporina não mostraram alterações significantes na contagem total e diferencial dos leucócitos, em relação aos animais controle.

TABELA 3 - Contagem total e diferencial de leucócitos de animais tratados com diversas concentrações crescentes de ciclosporina e animais controle.

CICLOSPORINA	TOTAL	LINFÓCITOS	MONÓCITOS	NEUTRÓFILOS	EOSINÓFILO
mg/kg					
zero	13.701 $\pm$ 3.100	10.214 $\pm$ 801	850 $\pm$ 296	1.950 $\pm$ 804	10 $\pm$ 9
5	13.804 $\pm$ 3.009	9.986 $\pm$ 706	820 $\pm$ 198	1.922 $\pm$ 814	11 $\pm$ 10
7	13.400 $\pm$ 2.914	10.140 $\pm$ 802	790 $\pm$ 201	1.850 $\pm$ 728	10 $\pm$ 9
10	14.010 $\pm$ 3.910	10.601 $\pm$ 901	836 $\pm$ 281	2.002 $\pm$ 890	12 $\pm$ 10
30	13.140 $\pm$ 3.520	10.106 $\pm$ 709	828 $\pm$ 264	1.980 $\pm$ 841	9 $\pm$ 8

V.4 - PROCESSO DE REPARO DO TECIDO CUTÂNEO DE RATOS NORMAIS

TRATADOS COM CICLOSPORINA

4 dias

Controle

A ferida cirúrgica apresenta-se recoberta por tecido necrótico e, subjacente à zona necrótica, observa-se tecido de granulação incipiente, composto principalmente de células fibroblásticas dispostas desordenadamente, vasos sanguíneos neoformados e áreas hemorrágicas. Em meio à proliferação fibroblástica, nota-se a presença de células mononucleadas. (Figs. 1A e 2A).

O exame sob luz polarizada demonstrou que o colágeno do tecido de granulação de 4 dias, apresenta-se em pequena quantidade e exibindo pouca birrefringência. Os feixes de colágeno são finos e delicados, denotando grau de organização incipiente. (Fig. 9).

Tratado

A ferida cirúrgica apresenta-se com a porção profunda do tecido necrótico substituída por tecido de granulação incipiente, formado por fibroblastos dispostos desordenadamente, capilares sanguíneos neoformados e presença de células mononucleares em menor quantidade que o controle. (Figs. 1 B e 2B). Sob luz polarizada, as fibras de colágeno do tecido de granulação são finos e delicadas, e apresentam-se em maior quantidade em relação ao grupo controle. (Fig. 10).

10 dias

Controle

O tecido de reparo está recoberto por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com grande quantidade de fibroblastos, capilares sanguíneos neoformados e fibras colágenas que se dispõem paralelamente à superfície. (Figs. 3A e 4A). Sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno apresentam-se bem compactados e exibem birrefringência de intensidade superior ao grupo anterior, embora inferior à da pele normal circunvizinha. (Fig. 11).

Tratado

A área da ferida é menor do que a do controle; anexos da pele já começaram a invadir o tecido de granulação, que está intensamente fibrosado, denotando o amadurecimento do tecido. (Figs. 3B e 4B). Sob luz polarizada, os feixes de fibras, na região do tecido de granulação, apresentam-se bem organizados, com birrefringência inferior ao da pele normal, mas superior à do grupo controle. (Fig. 12)

17 dias**Controle**

A área da ferida cirúrgica é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao epitélio observa-se acentuado fibrosamento do tecido, com os feixes de colágeno ordenados paralelamente ao epitélio, mas a população fibroblástica continua grande. (Figs. 5A e 6A). Sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno apresentam-se mais birrefringentes, denotando maior grau de amadurecimento do tecido, em relação ao tempo anterior.

Tratado

A área da ferida cirúrgica é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O tecido de granulação está mais fibrosado que o grupo controle, ainda com grande número de fibroblastos, e apresentando anexos da pele, o que denota maior maturação do tecido. (Figs. 5B e 6B). Sob luz polarizada, a região da ferida apresenta feixes de colágeno em maior quantidade e mais organizados em relação ao grupo controle, com birrefringência evidente.

21 dias**Controle**

A ferida é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao epitélio, observam-se

feixes densos de fibras colágenas, entremeados por pequeno número de fibroblastos fusiformes. Sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno apresentam-se bem organizados, com birrefringência superior à do grupo-controle.

Tratado

A ferida apresenta-se recoberta por tecido pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao epitélio, observam-se fibras colágenas densas, e alguns fibroblastos fusiformes, e anexos da pele. Sob luz polarizada, observam-se fibras colágenas com birrefringência superior ao grupo controle, indicando que o tecido está mais fibrosado.

28 dias

Controle

A ferida apresenta-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao tecido epitelial, apresentam-se fibras colágenas densas e compactas e reduzida população fibroblástica. (Figs. 7A e 8A). Sob luz polarizada, os feixes de fibras colágenas apresentam-se mais birrefringentes que o grupo anterior, porém, com menor birrefringência que a pele normal. (Fig. 13).

Tratado

A ferida apresenta-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao tecido

epitelial, não há distinção entre o local da formação do tecido de granulação e o tecido normal, denotando um amadurecimento maior que o grupo controle (Figs. 7B e 8B). Sob luz polarizada, os feixes de fibras colágenas apresentam-se com birrefringência semelhante à pele normal e superior ao grupo controle, denotando maior desenvolvimento do tecido. (Fig. 14).

V.5 - MEDIDAS HISTOFOTOMÉTRICAS

As medidas histofotométricas obtidas dos animais controle e animais tratados não mostraram diferenças estatisticamente significantes, indicando que não houve variação notável na síntese de glicosaminoglicanas, como indicado na tabela 4. Os dados obtidos através da histofotometria das lâminas de tecido de granulação nos diferentes dias de evolução podem ser encontrados no apêndice deste trabalho.

TABELA 4 - Médias (X), desvios padrões (S) das medidas histofotométricas, expressas em absorvância, para comparação dos grupos controles e tratados com ciclosporina, nos diversos tempos estudados. Através do teste "t" de Student (nível de 5%) não houve diferenças significativas na síntese de glicosaminoglicanas, nos períodos estudados.

DIAS	CONTROLE	TRATADO
4	0,036 $\pm$ 0,011	0,051 $\pm$ 0,014
10	0,096 $\pm$ 0,021	0,099 $\pm$ 0,012
17	0,042 $\pm$ 0,009	0,047 $\pm$ 0,014
21	0,029 $\pm$ 0,014	0,031 $\pm$ 0,010
28	0,015 $\pm$ 0,010	0,015 $\pm$ 0,009

ILUSTRAÇÕES

FIG.1: Cortes histológicos das feridas cirúrgicas dos grupos controle (A) e tratado (B), no período experimental de 4 dias.

(A) - Notar tecido de granulação incipiente (TG), recoberto por tecido necrótico (TN)

(B) - Tecido de granulação mais evoluído, com diminuição evidente da zona necrótica.

(TG) - Tecido de granulação

(TN) - Tecido necrótico

(Aum. 10 X; H.E.)

FIG.2: Aumento maior da Figura 1.

(A) - Observe-se zona de tecido necrótico (TN) e tecido de granulação incipiente (TG)

(B) - O tecido de granulação é mais evoluído (TG), com diminuição da zona de tecido necrótico (TN).

(Aum. 25 X; H.E.)

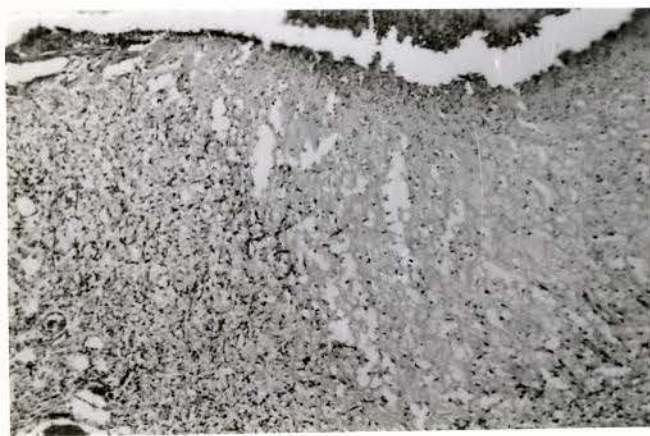


FIG.3: Tecido de granulação com 10 dias de evolução, dos grupos controle (A) e tratado (B).

(A) - Notar a área do tecido de granulação (TG), recoberto por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (E).

(B) - Notar a contração do tecido de granulação mais evoluído (TG), e formação de anexos da pele (seta).

(Aum. 10 X; H.E)

FIG.4: Aumento maior da figura 3.

(A) Observar o tecido de granulação com fibroblastos dispostos horizontalmente (TG)

(B) Observar a contração do tecido de granulação (TG) e anexos da pele (seta).

(Aum. 25 X; H.E)

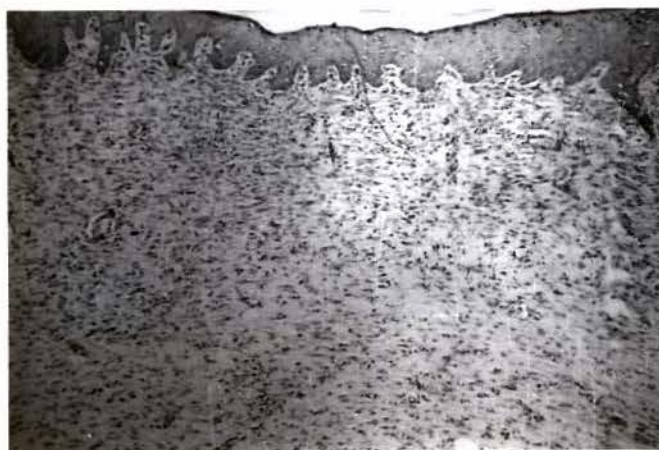
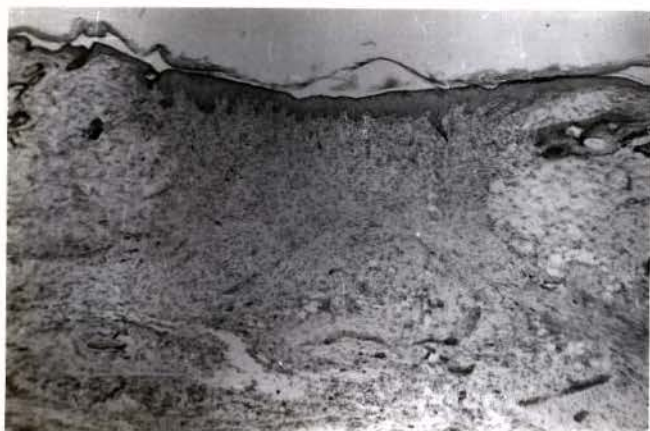


FIG.5: Tecido de granulação dos grupos controle (A) e tratado (B) com 17 dias de desenvolvimento.

(A) - Notar que o tecido de granulação está mais fibrosado e compacto que o período anterior (TG)

(B) - Notar que o tecido está fibrosado e mais contraído que o controle (TG), e a invasão de anexos da pele (seta)

(Aum. 10 X; H.E)

FIG.6: Aumento maior da figura 5.

(A) - Tecido de granulação mais fibrosado e compactado que o período anterior (TG), mas ainda bem distinto da pele normal (PN).

(B) - Observar maior contração que o controle e a invasão de anexos da pele (seta).

(Aum. 25 X, H.E)

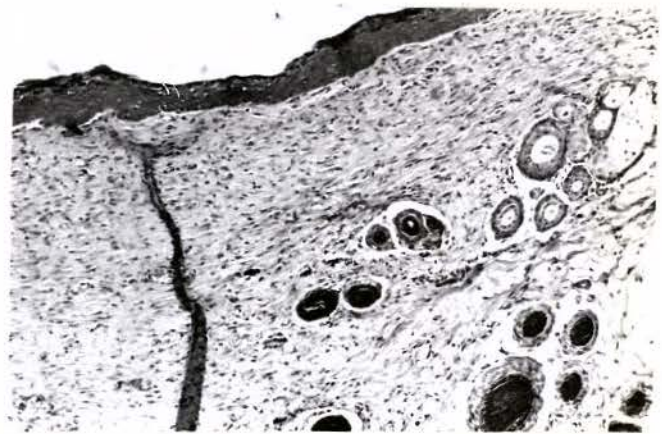
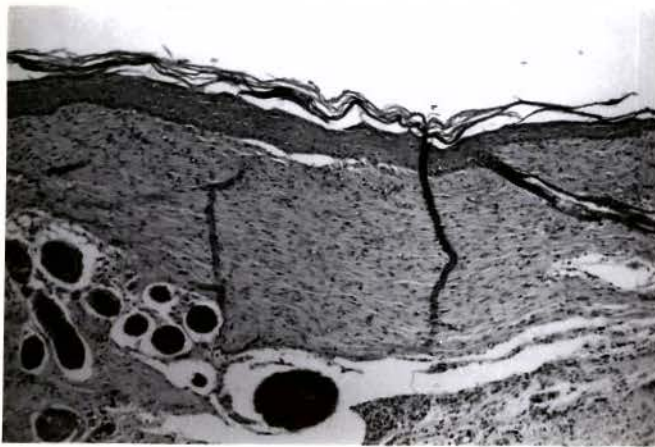
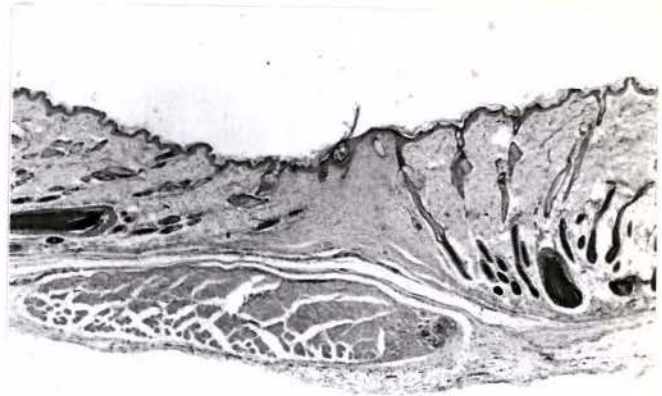
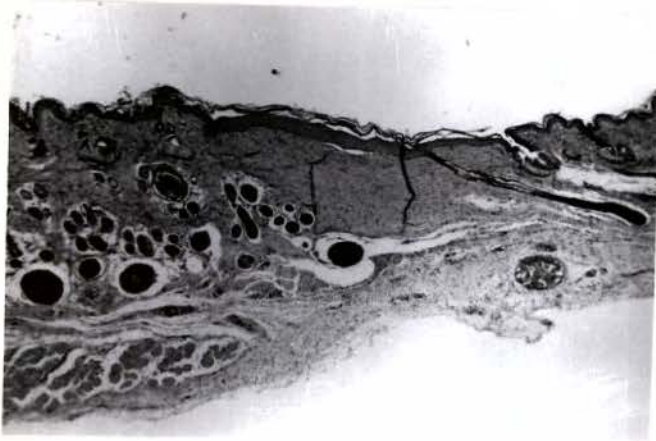


FIG.7: Tecido de granulação com 28 dias de evolução, dos grupos controle (A) e tratado (B).

(A) - Amadurecimento ainda incompleto do tecido de granulação (TG).

(B) - Note-se que praticamente não há distinção entre o local da formação do tecido de granulação e o tecido normal adjacente.

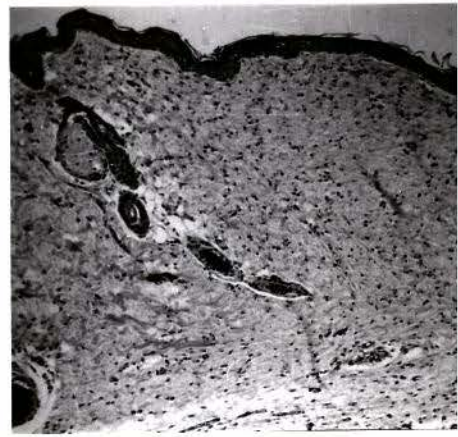
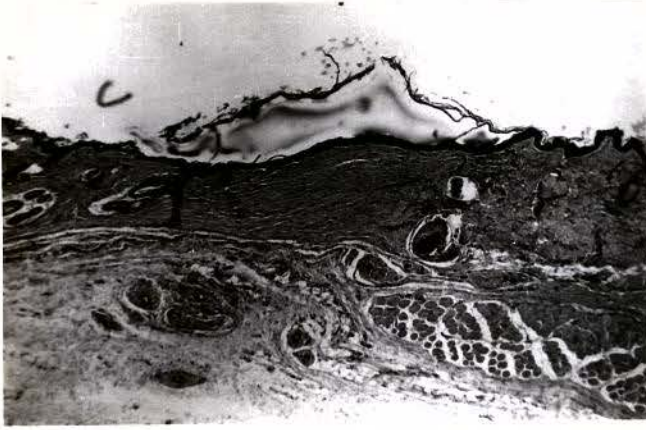
(Aum. 10 X; H.E)

FIG.8: Aumento maior da figura 7.

(A) - Notar o amadurecimento ainda incompleto do tecido de granulação (TG) .

(B) - Notar a similaridade do tecido cicatricial com a pele normal e a maior evolução em relação ao controle.

(Aum. 25 X; H.E)



Microscopia de polarização

(Todas as microfotografias tem o aumento de 25 X

Fig. 9 - Tecido de granulação com 4 dias de evolução controle). O tecido de granulação (TG) exhibe birrefringência em relação ao conjuntivo normal com delicadas fibras de colágenos.

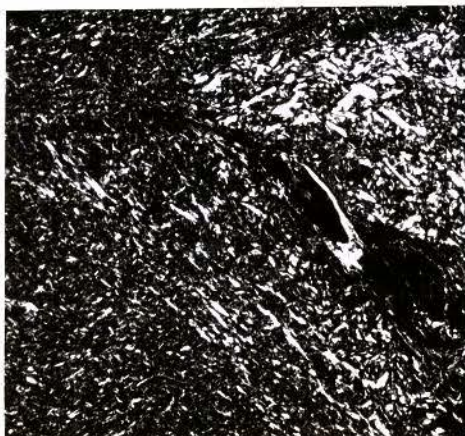
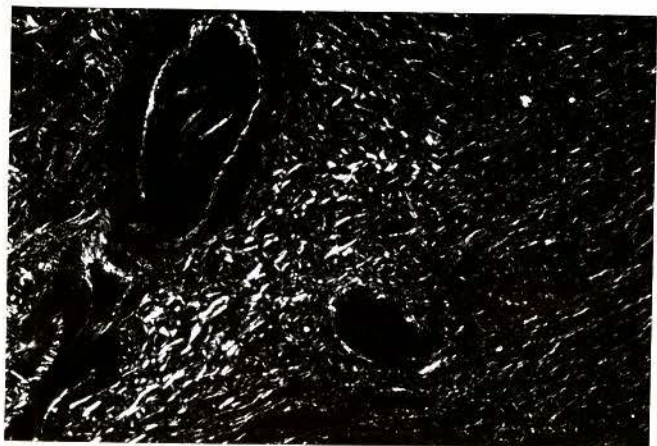
Fig. 10 - Tecido de granulação com 4 dias de evolução tratado). O tecido de granulação (TG) exhibe birrefringência de fibras que o grupo controle.

Fig. 11 - Tecido de granulação com 10 dias de evolução controle). Observe-se que o tecido de granulação (TG) exhibe um maior fibrosamento, com birrefringência de intensidade inferior ao da pele normal (CN).

Fig. 12 - Tecido de granulação com 10 dias de evolução tratado). Note-se que existe maior fibrosamento no tecido de granulação (TG) em relação ao controle, com birrefringência mais acentuada dos feixes de colágeno.

Fig. 13 - 28 dias de evolução do tecido de granulação controle). Note-se que a birrefringência dos feixes de colágeno do tecido de reparo (TR) é acentuada, mas inferior à pele normal (CN).

Fig. 14 - 28 dias de evolução do tecido de granulação tratado). Observe-se a semelhança de birrefringência com a pele normal e ao mesmo tempo maior que o controle.



VI - DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

Atualmente, as concentrações terapêuticas ótimas da ciclosporina ainda não são conhecidas com precisão. Extensas investigações sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica, favorecerão um melhor ajuste dos índices terapêuticos da ciclosporina, para que níveis reproduzíveis e rápidos possam individualizar o esquema de tratamento (KAHAN, 1985).

Devido à ampla variação inter e intra individual dos níveis de ciclosporina no sangue, o monitoramento da dose administrada é importante, e pode ser feito através de radioimunoensaio ou cromatografia, auxiliando a terapia no que tange a esse fármaco (GREEN, 1981; BUONPANE, 1990).

Baseado nesses monitoramentos, WOOD et al. (1985) propõem um limite terapêutico de 100 a 500 ng/ml/dia e ainda uma faixa de variação dos níveis séricos de 100 a 250 ng/ml de ciclosporina, no período pós transplante imediato; WASSEF et al. (1985), propuseram a administração de 5 mg/kg/dia, onde a concentração plasmática, após a administração dessa dose, varia de 100 a 500 ng/ml durante as primeiras 24 horas.

Neste trabalho, a avaliação da imunossupressão, quando da administração da ciclosporina, deu-se através da determinação da hipersensibilidade retardada ao DNCB. Com esta metodologia, a dose 10 mg/kg de peso corporal/dia, foi escolhida e administrada,

e os resultados mostraram que os animais tratados com dose igual ou superior a 5 mg/kg de peso corporal/dia tiveram respostas baixas à hipersensibilidade retardada. Os animais tratados com 50 mg/kg de peso corporal/dia morreram após o 3º dia de tratamento, mortes essas talvez causadas pelo fato da droga (nessa dosagem) ser hepatotóxica e nefrotóxica como descreve **COHEN** et al. (1984).

Animais tratados com diferentes doses de ciclosporina, não apresentam alterações no número total e parcial de leucócitos **THOMSON** et al. (1981). No presente trabalho, os animais tratados com ciclosporina também não mostraram alterações no quadro hematológico, quando comparado com os animais controle, resultado esse que está de acordo com o autor acima. Isto pode ser explicado pelo fato de que a ciclosporina atua diminuindo a liberação de linfocinas pelos linfócitos T, mas não impedindo a sua proliferação e seu desenvolvimento (**THOMAS** et al. 1986).

Com relação ao desenvolvimento do tecido de granulação, em condições normais, a resposta ao trauma cirúrgico inicia-se com a formação do tecido de granulação ao redor do 4º dia após a abertura da ferida, através da substituição do coágulo primitivo, com a proliferação e diferenciação dos fibroblastos e das células endoteliais, situação essa que permanece até ao redor do 20º dia. A partir de então, a fase proliferativa propriamente dita chega ao final, estabelecendo-se a organização e maturação do tecido. Por volta do 21º dia, a população celular, principalmente os fibroblastos, sofre marcada redução, enquanto as fibras colágenas aumentam em número (**VIZIOLI**, 1973 e 1975).

Com relação ao efeito da ciclosporina, a análise morfológica do tecido de granulação indicou que a formação desse tecido iniciou-se ao redor do 4º dia após a abertura da ferida. É importante salientar que, desde os primeiros dias, o desenvolvimento do tecido de granulação dos animais do grupo tratado com ciclosporina mostrou-se mais acentuado, traduzido pela menor área de tecido necrótico nas feridas dos animais tratados no período de 4 dias, em comparação aos aspectos exibidos pelos animais do grupo controle. Por volta do 10 dia, o desenvolvimento do tecido de granulação do grupo tratado mostrou maior retração e formação de anexos da pele que o correspondente do grupo controle, o que denota maior maturação, sendo que a partir de 17º dia, com a aproximação do período final de maturação, os tecidos de ambos os grupos continuaram exibindo diferenças no desenvolvimento em favor do grupo tratado. Porque os tecidos dos animais tratados, além de não sofrerem inibição, foram ao que tudo indica, beneficiados em relação ao grupo controle? É possível que a não interferência no desenvolvimento do tecido de granulação pela ciclosporina pode estar nos fenômenos de atração e migração de fibroblastos de células endoteliais para dentro do tecido, da seguinte maneira: sabe-se que os macrófagos, além de suas funções digestivas, sintetizam e secretam diversas substâncias biologicamente capazes de modular funções de células que estão ao seu redor. A interleucina 1 e os fatores de crescimento e diferenciação para fibroblastos e células endoteliais estão diretamente envolvidas no processo de

reparo. Constatou-se que as linfocinas dos linfócitos T e as monocinas, produtos derivados dos macrófagos, são bastante ativas no sentido de estimular a cinética dos fibroblastos "in vitro". Essas monocinas e linfocinas estimulam o crescimento de fibroblastos, e sabe-se que elas precisam ser ativadas por estímulos imunológicos, para demonstrar uma ótima atividade promotora de crescimento (ROBBINS, 1991)

THOMSON et al. (1983) afirmam que não existem evidências de que a ciclosporina interfira diretamente com a atividade dos macrófagos e HELLMAN et al. (1980) e KIMBALL et al. (1990), afirmam que a referida droga tem ação específica nos produtos celulares a partir da hematopoiese, isto é, em células T na fase G zero do ciclo celular, não atrapalhando sua evolução, mas somente inibindo um dos seus produtos, a interleucina 2. Assim, as monocinas dos macrófagos e a interleucina 1 dos linfócitos não são alteradas, e a diferenciação e crescimento de fibroblastos não ficam inibidos; portanto, não interferindo no desenvolvimento do tecido de granulação.

Resta também uma outra tentativa de explicar-se porque os tecidos dos animais tratados, além de não sofrerem inibição, foram, ao que tudo indica, beneficiados em relação ao grupo controle. É possível que a ciclosporina produza alterações na dinâmica da fase aguda da inflamação, que poderiam tornar o quadro agudo menos agressivo e, conseqüentemente, acelerar a evolução do tecido de granulação. Essas modificações podem estar relacionadas com a diminuição da produção de prostaglandinas e

leucotrienos, responsáveis respectivamente pela permeabilidade vascular e adesão leucocitária no processo de inflamação aguda, citadas por **BOTTCHER** et al. (1990). Também quanto à formação de folículos pilosos no tecido de granulação a partir do 10º dia após a abertura da ferida nos grupos tratados, pode ser explicada, sabendo-se que essa droga age estimulando a formação de folículos pilosos assim como a produção de pêlos (**KANITAKIS** et al, 1990).

A microscopia de polarização confirmou os resultados morfológicos acima discutidos, inclusive evidenciando que a quantidade de colágeno é maior no tecido de granulação do grupo tratado com a ciclosporina. Estas observações estão de acordo com os achados de **HOLMSTROM** et al. (1973).

Quanto às glicosaminoglicanas, os resultados demonstraram que ambos os grupos tiveram comportamento similar. Os valores das medidas histofotométricas dos animais do grupo controle e do grupo tratado com ciclosporina foram submetidas ao tratamento estatístico do teste "t" de Student e não houve diferença estatisticamente significativa. De qualquer forma, não houve nenhum problema em relação à produção de glicosaminoglicanas em nenhum dos grupos estudados.

Com relação a esses resultados, pesquisas específicas nesse campo tornam-se necessárias, para confirmação ou não dessas assertivas, ou a elaboração de hipóteses alternativas.

VII - CONCLUSões

VII - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, e dentro das condições experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que:

1 - A imunossupressão efetuada pela ciclosporina influenciou de maneira positiva na evolução do tecido de granulação dos animais tratados, acelerando o processo de cicatrização.

2 - A síntese de glicosaminoglicanas não foi alterada pela imunossupressão provocada pela ciclosporina, em nenhum tempo de evolução do tecido de granulação dos animais tratados.

SUMMARY

The cellular immune response, plays an important role either in the inflammatory reaction or in the wound healing process. Cyclosporin is a new immunosuppressive agent used in organ transplantation. In this work it was studied its effects on the wound healing process, by the use of light microscopy, polarization microscopy and histophotometry. Male rats weighting 220g in average received intraperitoneally a 10 mg/kg dose of cyclosporin/day (dosage choosed through the test with DNCB) during 28 days. The control group received saline solution in equal volume and period. The results showed that cyclosporin did not alter the synthesis of glycosaminoglycans, although it caused an acceleration in the healing process in the treated animals.

RESUMO

O sistema imunológico, através da resposta imune celular desempenha uma importante função tanto na reação inflamatória, quanto no processo de cicatrização de feridas. A ciclosporina, é um novo agente imunossupressor da resposta imunológica, e neste experimento estudou-se o efeito dessa droga sobre o processo de reparo, através da microscopia de luz, de polarização e através da histofometria. Ratos machos pesando em média 220 g, receberam via intraperitonal, 10 mg/kg de peso corporal/dia (dosagem escolhida através do teste com DNCB) durante 28 dias, e o grupo controle recebeu solução salina em igual volume e período. Os resultados mostraram que nos animais imunossuprimidos, a síntese de glicosaminoglicanas não foi alterada, mas a ciclosporina influenciou de maneira positiva o processo de reparo, acelerando a cicatrização.

VIII - SUMMARY

E

RESUMO

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHONEN, J.; NEMLANDER, K.; WIKTOROWICZ, E.; WILLEBRAND, R.; HEKALI, M.L. & HAYRY, P. - Effect of cyclosporine on wound healing. Transplant. Proc., 15: 3092-3 1983.

- BARBUL, A.; SISTO, D. & EFRON, G. - Thymic inhibition of wound healing: abrogation by adult thymectomy. J. surg. Res., 32: 338-42, 1982.

- BARBUL, A.; BRESLIN, R.J.; WOODYARD, J.P.; WASSERKRVG, H.L. & EFRON, G. - The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. Ann. Surg., 209: 479-83, 1989.

- BAZIN, S.; LE LOUS, M. & DE LAUNAY, A. - Collagen in granulation tissues. Agents Actions, 6: 272-6, 1976.

- BENTLEY, J. P. - Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. Ann. Surg., 165: 186-91, 1967.

- BOTTCHEER, W.; WANNER, K.; PIGNAT, W. - Anti-inflammatory effects of cyclosporin A (CSA) in carragheenan - induced pleurisy in rats. Agents and Actions. 29: 105-107, 1990.

- BOREL, J. F. & LAFFERTY, K. J. - Cyclosporine: speculation about its mechanism of action. Transplant. Proc., 15: 1881-5, 1983.

- BUONPANE, E. - Therapeutic drug monitoring of cyclosporine (CSA). Connecticut medicine. 54: 17-19, 1990.

- CALABRESI, O. & PARKS, R. G. - Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: GILMAN, A. G. et al. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. p. 849-50.

- CALNE, R. - The use of cyclosporin A in clinical organ grafting. Ann. Surg. 196: 330, 1982.

- CARPENTER, B. C. & STROM, B. T. - Transplantation immunology. In: PARKER, C. W. - Clinical immunology. Toronto, Saunders, 1980. v.1, p.

- COHEN, B. H.; LEWIS, L.A. & RESNIK, S.S. - Wound healing: a brief review. Int. J. Dermatol. 14: 722-6, 1975.

- COHEN, D. J.; LOERTSCHER, R.; RUBIN, M.F.; TILNEY, N.Y.; CARPENTER, C.B. & STROM, T.B. - Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. Ann. intern. Med. 101: 667-82, 1984.

- CORSINI, A. C.; BELLUCI, S.B. & COSTA, M.G. - A simple method of evaluating delayed type of hypersensitivity in mice. J. immunol. Methods, 30: 195-200, 1979.
- DALEY, T. D. & WYSOCKI, G. P. - Cyclosporine therapy: it's significance to the periodontist. J. Periodontol. 55: 708-12, 1984.
- DUNPHY, J. E. - Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New England J. Med., 253: 847-51, 1955.
- EISINGER, D. R. & SHEIL, A.G. R. - A comparison of the effects of cyclosporin - A and standard agents on primary wound healing in the rat. Surg. Gynecol. Obstet., 160: 135-8, 1985.
- FISHEL, R. - Cyclosporine - A: impairs wound - healing in rats. J. surg. Res., 34: 572-5, 1983.
- FISHER, E. R. & FISHER, B. - Lack of thymic effect on wound healing: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119: 61, 1965.
- GREEN, C. J. - Immunossupression with cyclosporin A: a review. Diagn. histopathol: 4: 157-74, 1981.

- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A.G. - As bases farmacológicas da terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987.

- GOTO, T.; KINO, T. & HATANAKA, H. - Discovery of FK 506 a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces tsukubaensis. Transplant. Proc. 19 (suppl 6): 4, 1987.

- HELLMAN, A. & GOLDMAN, J.M. - Effects of cyclosporin A on human granulopoiesis in vitro. Transplantation, 30: 386-7, 1980.

- HOLMSTRON, H.; ZEDERFELDT, B. & AHONEN, J. - Scand J. plast. reconstr. Surg., 7: 97, 1973 Apud AHONEN, J.; NEHLANDER, A.; WEKTORAWICS, K.; WILLEBRAND, E.; HEKALI, R; LALLA, M.; HAYRY, P. - ref. 1.

- HUANG, C.; MING, K.L., & MAN, T.F. - Hepatitis B liver disease in cyclosporine treated renal allograft recipients. Transplantation, 49: 540-4, 1990.

- JOHNSON, R.L. & ZIFF, M. - Lymphokine stimulation of collagen Accumulation. J. clin. Investig., 58: 240-52, 1976.

- KAHAN, B.D. - Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Transplantation, 40: 457-76, 1985.
- KAHAN, B.D. - Cyclosporine: the agent and it's actions. Transplant. Proc., 17B (4): 5-18, 1985.
- KALIL, J. & NEUMANN, J. - Imunologia dos transplantes In: GALICH, V. L. G. & VAZ, C.C.A. - Imunologia básica. São Paulo, Artes Médicas, 1988. p. 293-307.
- KIMBALL, M.P.; KERMAN, H.R. & KAHAN, D. - Sensitivity of intracellular signals responsible for cell cycle progression to cyclosporine. Transplantation, 49: 186-91, 1990.
- KANITAKIS, J.; THIVOLET, J. - Cyclosporine. Arch Dermatol, 126: 369-75, 1990.
- LISON, L. - Histochimie et cytochimie animales: principes et methods. Paris, Gauthier - Villars, 1960. v.1, p. 280-1.
- MIHATSCH, M. J.; RYFFEL, B.; HERMLE, M.; BRUNNER, F.P. & THIEL, G. - Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. Clin. Nephrol., 25: 52-8, 1986.

- NELSON, P.W. - Cyclosporine. Surg. Gynecol. Obstet., 159: 297-308, 1984.

- NEMLANDER, A.; AHONEN, J.; WIKTOROWICZ, K.; WILLEBRAND, E. & HEKALI, R. - Effect of cyclosporine on wound healing. Transplantation, 36: 1-6, 1983.

- NIESSEN, G.; MARQUET, R.L.; BIJNEN, A.B.; OBERTO, H. & JEEKEL, J. - The effect of cyclosporin - A and blood transfusion on cardiac allograft survival in rats. Surgery, 91: 340, 1982.

- NUSSENBLATT, R. B. & PALLESTINE, A. G. - Cyclosporine: immunology, pharmacology and therapeutic uses. Surv. Ophthalmol., 31: 159-69, 1986.

- OLUWASANMI, J. O.; LUCAS, D.O. & CHVAPIL, M. - Effect of a concurrent immune response on the collagen synthesis around implanted ivalon sponges in rats. Plast. reconstr. Surg., 58: 601-7, 1976.

- PEARSE, A. G. E. - Histochemistry: theoretical and applied. 3. ed. London, Churchill, 1968. v.1 p. 33.

- PESSA, E. M.; BLAND, K.J. & COPELAND, E.M. - Growth factors and determinants of wound repair. J. surg. Res. 42: 207-17, 1987.

- PLATZ, K.P.; SOLLINGER, H.W.; HULLETT, D.A.; ECKHOFF, D.E.; EUGUI, E.M. & ALLISON, A.C. - R.S. - 61443: a new, potent immunosuppressive agent. Transplantation, 51: 27-31, 1991.

- PTACHCINSKI, R.J.; BURCKART, G.J. & VENKATARAMAN, R. - Cyclosporine. Drug, intell. clin. Pharm., 19: 90-100, 1985.

- REED, R. B. & RICHARD, A. F. C. - Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. II. J. Am. Acad. Dermatol., 13 (6): Dec., 1985.

- RIED, M.; GIBBONS, D.K.; VAN BUREN, C.T.; FLECHNER, S.; KAHAN, B.P. - Cyclosporine levels in human tissue of patients treated for week to one year. Transplant Proc., 15 (4, suppl. 1): 2434-7, 1983.

- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S & KUMAR, V. - Patologia estrutural e funcional, 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 67-79.

- ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. - Transplante e rejeição. Imunologia. São Paulo, Manole, 1989. p. 24.1-24.9.

- RYFFEL, B. - Experimental toxicological studies with cyclosporin - A: preclinical research. Basel, Sandoz, 1989. Chapter 5, p. 45-75.

- SHINDZAWA, T.; BESCHORNER, W.E. & HESS, A.D. - The thymus and prolonged administration of cyclosporine. Transplantation. 50: 106-111, 1990.

- SIDERAS, P.; FUNA, K. & ZALCBERG, I. - Analysis by in situ hybridization of cells expressing mRNA for IL-4 in the developing thymus and in peripheral lymphocytes from mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 218, 1988.

- STARSH, T. et alii - Cyclosporin A and steroid therapy in sixty - six cadaver kidney recipients. Surg. Gynecol. Obstet., 153: 486, 1981.

- STEINMULLER, D. R. - Cyclosporine and organ transplantation. Cleveland clin. Quart. 52: 263-70, 1985.

- SUMRANI, N.B.; DELANEY, V.; DING, Z.; DAVIS, R.; DASKALAKIS, P.; FRIEDMAN, E.A.; KAALID, M.B. & HONG, J.H. - Diabetes mellitus after renal transplantation in the cyclosporine. An Analysis of risk Factors. Transplantation, 51: 343-347, 1991.

- THOMAS, S. E. & GORDON, D. S. - Cyclosporine Sth. med. J., 79: 205-14, 1986.

- THOMSON, A. W.; WHITING, P.H.; CAMERON, J.D.; LESSELS, S.E. & SIMPSON, J.G. - A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic doses of cyclosporin - A. Transplantation, 31: 121-4, 1981.

- THOMSON, A. W. - Immunobiological properties of cyclosporin - A: a review. Aust. J. exp. Biol. med. Sci.; 61: 147-72, 1983.

- TOSATO, G.; PIKE, S.E.; KOSKI, J.R.; BLAESE, R.M. - Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporin-A. J. immun., 128: 1986-91, 1982.

- TRESHAN, J.J.; WHITWORTH, J.A.; SCOGGINS, B.A. & BENETT, W.N. - Cyclosporine - induced hypertension in sheep. Transplantation, 49: 144-148, 1990.

- TUTSCHKA, P.J.; BESCHORNER, W.E.; ALLISON, A.C.; BURNS, W.H. & SANTOS, G.W. - Use of cyclosporin - A in allogenic bone marrow transplantation in the rat. Nature, 280: 148, 1979.

- VADAS, M.A.; MILLER, J.G. & WHITELAW, A. - A radioisotopic method to measure delayed type hypersensitivity in the mouse. I. Studies in sensitized and normal mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 49: 670-92, 1975.

- VATHSALA, A.; VERAM, R.; SCHOENBERG, L.; LEWIS, R.M.; VAN BUREN, C.T.; KERMAN, R.H. & KAHAN, B.D. - Proteinuria in cyclosporine - treated renal transplant recipients. Transplantation, 49: 35-41, 1990.

- VIZIOLI, M. R. - Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. Acta anat., 85: 368-77, 1973.

- VIZIOLI, M. R. - Relação entre fosfomono - esterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975. (Tese-Livre Docência - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP).

- WAGNER, H. - Cyclosporin - A: mechanism of action. Transplant. Proc., 15: 523-6, 1983.

- WAHL, S. M.; WAHL, L.M. & MCCARTHY, J.B. - Lymphocyte - mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J. Immunol., 121: 942-6, 1978.

- WARREN, B.S.; PELKER, R.R. & FRIEDLAENDER, G.E. - Effects of short-term cyclosporin - A on biomechanical Properties of intact and fractured in the rat. Journal of orthopaedic Research, 3: 96-100, 1985.

- WASIK, M.; GORSKI, A.; STEPIEN, S.B. & LAGODZINSKI, Z. -
Effect of FK-506 versus cyclosporine on human natural and
antibody - dependent cytotoxicity reactions in vitro.
Transplantation, 51: 268-270, 1991.
- WASSEF, R.; COHEN, Z. & LANGER, B. - Pharmacocinetic
profiles of cyclosporine in rats: influence of route of
administration and dosage. Transplantation, 40: 489-93,
1985.
- WILKE, W.S.; CAMISA, C.; LICHTIN, A. - Novel uses for
cyclosporine A. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 57:
116-117, 1990.
- WISKOTT, E. - Sandimmun: The prototype of a new generation
of immunosuppressive agents. Int. Sandoz Gaz. (45), 1983.
- WOOD, A.J. & LEMAIRE, M. - Pharmacologic aspects of
cyclosporine therapy. Pharmacokinetics. Transplantation
Proc., 17: 27-32, 1985.

X - APÊNDICE

Medidas, obtidas por meio de histofotometria, das lâminas de tecido de granulação nos diferentes dias de evoluções estudados, nos grupos controles, e tratados com ciclosporina.

1- Grupo Controle - 4 dias

ANIMAL 1 -	0,096	0,019	0,033	0,037	0,023	0,031
	0,047	0,023	0,061	0,017	0,012	0,032
	0,037	0,060	0,030	0,012	0,027	0,040
	0,028	0,029	0,050	0,022	0,028	0,028
	0,036	0,072	0,022	0,025	0,030	0,030

ANIMAL 2 -	0,098	0,073	0,046	0,035	0,030	0,019
	0,043	0,054	0,068	0,018	0,017	0,029
	0,028	0,046	0,070	0,017	0,029	0,036
	0,047	0,028	0,041	0,023	0,023	0,030
	0,028	0,072	0,026	0,016	0,031	0,031

2 - Grupo Tratado - 4 dias

ANIMAL 1 -	0,083	0,059	0,078	0,050	0,053	0,048
	0,079	0,080	0,079	0,048	0,068	0,036
	0,079	0,036	0,044	0,071	0,058	0,027
	0,038	0,056	0,057	0,038	0,039	0,051
	0,056	0,071	0,036	0,090	0,036	0,078

ANIMAL 2 -	0,082	0,051	0,061	0,046	0,032	0,023
	0,078	0,046	0,048	0,044	0,026	0,030
	0,053	0,043	0,047	0,046	0,046	0,038
	0,048	0,048	0,045	0,048	0,047	0,035
	0,049	0,047	0,044	0,030	0,047	0,029

3 - Grupo Controle - 7 dias

ANIMAL 1 -	0,073	0,091	0,050	0,070	0,050	0,079
	0,067	0,093	0,092	0,089	0,091	0,093
	0,059	0,079	0,078	0,074	0,093	0,071
	0,061	0,060	0,091	0,064	0,078	0,081
	0,079	0,077	0,090	0,097	0,078	0,081

ANIMAL 2 -	0,066	0,075	0,076	0,089	0,091	0,067
	0,078	0,070	0,078	0,088	0,056	0,081
	0,077	0,084	0,079	0,078	0,041	0,068
	0,079	0,090	0,069	0,076	0,070	0,067
	0,048	0,090	0,070	0,070	0,066	0,081

4 - Grupo Tratado - 7 dias

ANIMAL 1 -	0,076	0,090	0,078	0,074	0,093	0,067
	0,081	0,080	0,098	0,067	0,071	0,080
	0,073	0,068	0,090	0,090	0,090	0,081
	0,081	0,088	0,090	0,081	0,088	0,087
	0,081	0,076	0,077	0,076	0,077	0,056

ANIMAL 2 -	0,067	0,071	0,098	0,089	0,071	0,079
	0,077	0,081	0,077	0,071	0,098	0,089
	0,080	0,056	0,069	0,078	0,056	0,090
	0,081	0,090	0,081	0,078	0,071	0,051
	0,090	0,053	0,054	0,081	0,088	0,050

S - Grupo Controle - 10 dias

ANIMAL 1 -	0,092	0,089	0,098	0,095	0,096	0,087
	0,134	0,114	0,089	0,094	0,117	0,097
	0,116	0,098	0,111	0,090	0,091	0,091
	0,090	0,098	0,087	0,095	0,096	0,101
	0,089	0,112	0,090	0,098	0,096	0,097

ANIMAL 2 -	0,098	0,093	0,091	0,094	0,093	0,098
	0,117	0,107	0,107	0,091	0,089	0,079
	0,112	0,101	0,105	0,096	0,090	0,070
	0,101	0,095	0,097	0,102	0,097	0,080
	0,091	0,098	0,098	0,097	0,079	0,088

6 - Grupo Tratado - 10 dias

ANIMAL 1 -	0,097	0,089	0,097	0,088	0,089	0,106
	0,098	0,111	0,098	0,099	0,096	0,117
	0,112	0,101	0,093	0,090	0,098	0,099
	0,105	0,114	0,096	0,098	0,099	0,117
	0,097	0,105	0,098	0,099	0,095	0,094

ANIMAL 2 -	0,099	0,097	0,098	0,095	0,114	0,105
	0,098	0,096	0,095	0,094	0,096	0,099
	0,105	0,074	0,074	0,096	0,093	0,098
	0,117	0,095	0,105	0,115	0,090	0,093
	0,114	0,112	0,097	0,098	0,104	0,103

7 - Grupo Tratado - 14 dias

ANIMAL 1 -	0,098	0,097	0,086	0,078	0,090	0,098
	0,104	0,083	0,095	0,096	0,090	0,097
	0,097	0,090	0,090	0,105	0,101	0,097
	0,105	0,086	0,060	0,096	0,090	0,099
	0,099	0,081	0,078	0,097	0,085	0,101

ANIMAL 2 -	0,101	0,096	0,095	0,078	0,081	0,102
	0,107	0,098	0,102	0,084	0,098	0,100
	0,099	0,097	0,094	0,096	0,097	0,097
	0,098	0,096	0,099	0,097	0,097	0,081
	0,102	0,098	0,097	0,089	0,096	0,099

8 - Grupo Tratado - 17 dias

ANIMAL 1 -	0,036	0,020	0,060	0,051	0,036	0,060
	0,046	0,069	0,043	0,049	0,040	0,071
	0,032	0,071	0,041	0,047	0,041	0,098
	0,020	0,048	0,042	0,043	0,043	0,046
	0,044	0,050	0,043	0,065	0,055	0,048
ANIMAL 2 -	0,041	0,042	0,051	0,033	0,065	0,045
	0,043	0,058	0,049	0,044	0,047	0,037
	0,069	0,030	0,047	0,090	0,043	0,045
	0,038	0,041	0,065	0,070	0,041	0,038
	0,042	0,037	0,031	0,021	0,039	0,043

9 - Grupo Tratado - 21 dias

ANIMAL 1 -	0,023	0,026	0,018	0,035	0,033	0,044
	0,027	0,025	0,019	0,024	0,041	0,036
	0,036	0,030	0,021	0,023	0,060	0,038
	0,021	0,029	0,043	0,030	0,038	0,037
	0,019	0,032	0,034	0,031	0,036	0,046

ANIMAL 2 -	0,036	0,029	0,036	0,041	0,027	0,026
	0,027	0,025	0,023	0,029	0,026	0,027
	0,033	0,030	0,040	0,024	0,018	0,030
	0,041	0,025	0,036	0,028	0,036	0,028
	0,039	0,026	0,027	0,026	0,032	0,028

10 - Grupo Tratado - 28 dias

ANIMAL 1 -	0,013	0,010	0,011	0,009	0,017	0,010
	0,012	0,009	0,014	0,010	0,011	0,031
	0,022	0,013	0,016	0,012	0,014	0,016
	0,024	0,018	0,020	0,016	0,019	0,016
	0,028	0,012	0,021	0,020	0,021	0,017

ANIMAL 2 -	0,011	0,011	0,014	0,010	0,018	0,013
	0,014	0,013	0,016	0,017	0,011	0,017
	0,013	0,012	0,013	0,019	0,016	0,016
	0,024	0,018	0,011	0,017	0,012	0,010
	0,012	0,018	0,015	0,011	0,031	0,019