ALMIR DE SOUZA MAIA

EFEITOS DO 2,4 DINITROFENOL, CARNOSINA E TIROXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Grau de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental, na área de Patologia.

PIRACICABA

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus saudosos e inesquecíveis pais, *BRAULINO DE SOUZA MAIA* e *ALCIDES DE SOUZA MAIA*, que se deram para proporcionar-me educação, por meio da renúncia e do exemplo de suas vidas;

À minha querida esposa *SUSANA*, pela irrestrita compreensão, incentivo e amor transmitidos a todo instante;

Aos meus adoráveis filhos *ANDRÉ* e *SAMUEL*, pela indizível alegria e pelo que representam para mim,

ofereço este trabalho.

Aos meus inestimáveis irmãos *MOAIR*, *CAROLINA*, *VERONICE*, *ELENICE* e *ADRIEL*, pelo fraterno amor que sempre nos uniu,

minha admiração e apreço.

Ao Professor Doutor *MÁRIO ROBERTO VIZIOLI*, cuja orientação sábia e segura ensejou minha formação científica e consecução deste trabalho de pesquisa,

meu respeito e homenagem.

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, na pessoa de seu Magnífico Reitor *PLÍNIO ALVES DE MORAES*, pela oportunidade oferecida para os meus estudos de Pós-Graduação;

À UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA, na pessoa de seu Magnífico Reitor *ELIAS BOAVENTURA*, pelo estímulo e apoio em todos os instantes dos estudos de Pós-Graduação,

o meu agradecimento.

À SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS,

na pessoa de Sua Excelência o Sr. Secretário de Estado, pelo apoio, concedendo-me Licença para os estudos de Pós-Graduação,

o meu agradecimento.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor Dr. *ANTONIO CARLOS NEDER*, DD. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas pelo irrestrito apoio e incentivo à Pesquisa nesta Faculdade;

Ao Professor Dr. *ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA*, Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela dedicação, espírito de serviço e solidariedade com que me distinguiu durante o transcorrer deste trabalho;

Ao Professor Dr. *LOURENÇO BOZZO*, Professor Titular responsável pela Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa;

Ao Professor Dr. *GILBERTO D'ASSUNÇÃO FERNANDES* e ao Professor Dr. *ALCIDES GUIMARÃES*, pela eficiente e oportuna contribuição na elaboração deste trabalho;

Ao Professor Dr. *MOUSTAFA MOHAMMAD EL-GUINDY*, pelo valoroso incentivo que me foi dispensado;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo extraordinário cabedal de conhecimentos transmitidos;

Ao Professor Dr. *FAUSTO BÉRZIN*, pelas excelentes sugestões fornecidas;

Ao prezado colega Professor *EDUARDO DIAS DE ANDRADE*, que muito de perto me acompanhou e me ajudou nesta pesquisa;

À Professora *MIRIAM CAMPOS BOAVENTURA*, pelo apoio e atenção;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo companheirismo dispensado;

À Sra. *IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA*, Bibliotecária Chefe, e demais funcionárias da Bibliotêca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela colaboração na revisão bibliográfica;

Ao Sr. *IVO DE PAULA TOLEDO*, Auxiliar de Laboratório da Área de Anatomia, pela grande colaboração nos trabalhos de preparo dos animais e outras rotinas de laboratório;

Ao Sr. *ANTONIO KERCHES DE CAMPOS*, Técnico de Laboratório da Área de Patologia, pelo excelente trabalho de preparações histológicas;

Às Funcionárias *MARIA APARECIDA NALIN e SUELI SOLIANI*, pela grande ajuda;

A todos quantos, direta ou indiretamente auxiliaram na elaboração desta pesquisa,

o meu reconhecimento

e agradecimento.

R E F L E X Ã O

Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.

Confia no Senhor de todo coração e não te estribes no teu próprio entendimento.

Feliz o homem que acha sabedoria e o homem que adquire conhecimento.

Provérbios :
2.6; 3.5, 13.

S U M Á R I O

Pág.

1. INTRODUÇÃO 1

2. PROPOSIÇÃO 13

3. MATERIAL E MÉTODOS 15

3.1. Seleção dos animais 16

3.2. Equipamento e material utilizados 16

3.3. Implantação das esponjas 17

3.4. Distribuição dos grupos experimentais 18

3.5. Drogas utilizadas 18

3.6. Esquema de sacrifício dos animais 20

3.7. Técnica de laboratório 20

3.8. Observações microscópicas e documentação 20

4. RESULTADOS 21

4.1. Descrição dos resultados 22

4.2. Mapa de estudo comparativo 29

4.3. Legendas das fotomicrografias 32

5. DISCUSSÃO 53

5.1. Carnosina 55

5.2. 2,4 dinitrofenol 58

5.3. Tiroxina 59

6. CONCLUSÕES 62

7. RESUMO 64

SUMMARY 67

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação (do latim "inflammatione", incendiar) é uma série de transformações dinâmicas, que ocorrem no tecido conjuntivo, em resposta a um agente agressor, seja ele de natureza física, química, biológica ou de fundo imunológico.

A seqüência dos eventos inicia-se pela liberação de mediadores químicos na região, que possibilitam um maior afluxo sangüíneo e um aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos pertencentes à microcirculação local. A exsudação plasmática e celular, visa, entre outras funções, diluir ou neutralizar o agente invasor, ou então remover os restos teciduais conseqüentes à lesão. Após a remoção dos "debris" da área inflamada, iniciam-se os fenômenos proliferativos. Os fibroblastos sintetizam colágeno e mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas); angioblastos, na retaguarda, induzem a neoformação de microcapilares sangüíneos, com o objetivo de nutrir o tecido em formação. Surge, nesse momento, uma massa avermelhada e fibrosa, denominada tecido de granulação. Dentro

do processo de reparação do organismo animal, a formação deste tecido é, sem dúvida, de primordial importância.

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo, responsáveis pela formação do colágeno. Produzem também a maioria das glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos ácidos) do tecido de granulação, que permitem a agregação do colágeno em feixes.

Grande parte dos autores indica que os fibroblastos do tecido de granulação se originam de células mesenquimais indiferenciadas e fibrócitos em estado de repouso, existentes junto da área lesada, e se tornam ativos após a lesão do tecido. Ainda, células perivasculares (pericitos) da região podem modificar-se em fibroblastos.

Entretanto, outros autores afirmam que os fibroblastos do tecido de granulação têm origem hematógena, mormente de monócitos. Na verdade, não existem provas que eliminem uma ou outra hipótese, mas é provável que ambas estejam corretas, tendo os fibroblastos do tecido de granulação as duas origens.

O colágeno (do grego "kólla", cola) é uma proteína produzida pelos fibroblastos. As moléculas dessa proteína são longas (mais ou menos 2.800 Å), com cerca de 15 Å de espessura. Cada molécula consiste em três cadeias polipeptídicas, unidas sob a forma de uma tríplice hélice. As cadeias recebem o nome de cadeias alfa, cada uma delas consistindo em seqüência de três aminoácidos que se repetem ao longo de seu trajeto. O primeiro aminoácido dessa seqüência pode ser qualquer aminoácido de uma série deles, desde que seja diferente dos outros dois seguintes. O segundo aminoácido é prolina ou lisina, e o terceiro é sempre glicina (HAM, 1977).

A síntese do colágeno no tecido de granulação é detectável a partir do 4º ao 7º dia de desenvolvimento.A partir daí, a atividade dos fibroblastos aumenta, atingindo o máximo entre 14 e 20 dias. Isso foi constatado pelo método de radioautografia, utilizando-se a prolina marcada, conforme trabalhos de LOWTHER et alii (1961); PROCKOP et alii - (1962); HAUSMANN & NEUMANN (1961); MADDEN & PEACOCK (1968), que pesquisaram a atividade específica da prolina na biossíntese do colágeno por meio de isótopos radioativos.Estudos radioautográficos feitos por VIZIOLI (1975) demonstraram que a síntese do colágeno no tecido de granulação é ativa a partir dos primeiros dias de seu desenvolvimento, atingindo o pico entre 15 e 20 dias. Esses estudos demonstraram e confirmaram pesquisas anteriores, de que a síntese do colágeno é maior do 15º ao 20º dia de desenvolvimento do tecido. Após a terceira semana, a atividade de síntese pelos fibroblastos cai drasticamente, atingindo níveis inferiores aos primeiros 10 dias.

O colágeno é sintetizado sob a forma de procolágeno, intracelularmente, nos ribosomas do retículo endoplasmático dos fibroblastos secretores. O material ali produzido é transferido para as vesículas do aparelho de Golgi, ou, então, diretamente para o espaço intracelular. Moléculas de tropocolágeno são lançadas pela célula para o exterior, onde se tornam visíveis pela polimerização, acreditando-se que ocorre do lado externo da membrana celular, bem junto a ela. Extracelularmente, as moléculas de tropocolágeno tornam-se agregadas lateral e longitudinalmente, e formam fibrilas de colágeno, que apresentam estriação cruzada típica,com uma periocidicidade de 640 Å.

Posteriormente, essas fibras se agrupam, para dar lugar à formação das fibras de colágeno. Estas são visualizadas pela microscopia comum, e posteriormente se tornam fibras colágenas amadurecidas.

Outras fibras presentes no processo de formação do tecido de granulação são as reticulares, desde o início de formação do tecido de granulação. Elas originam-se da mesma forma que as colágenas. Ao contrário das colágenas,estas são finas e se constituem de uma forma de colágeno e carboidrato. Recebem esse nome por se disporem geralmente em tramas (do latim "rete", rede), e fornecem dessa forma uma rede, conhecida como malha de reticulina, que funciona como suporte para as células do tecido.

As moléculas de protocolágeno polimerizadas fora da célula agregam-se e formam fibrilas que, por sua vez, se unem em fibras, observáveis ao microscópio comum. Essas fibras finas e delicadas são conhecidas como fibras argirófilas, porque se impregnam fortemente pela prata, mas representam dois tipos de fibras: o primeiro tipo, chamado pré-colágenas, que se diferencia posteriormente em fibras colágenas; o segundo tipo, que permanece como uma espécie de fibra fina e delicada, que forma uma rede por todo o tecido, conhecida como fibra de reticulina.

Conforme STEIN & WOLMAN (1958), a síntese das fibras no processo de reparação se inicia em torno do 4º dia após injúria, completando-se no 8º dia. Já GOULD (1958), trabalhando com tecido obtido por implante de esponja de PVC, concluiu que a formação de fibra se dá entre o 5º e o 7º dias do desenvolvimento do tecido. Chegaram à mesma conclusão JOHNSON & Mc MINN (1958). Tais autores concluiram também que a

fibroplasia é mais intensa durante a 2ª e 3ª semanas de desenvolvimento do tecido.

A grande maioria dos estudos posteriores realizados nesse sentido (JACKSON & BENTLEY, 1960; ROSS & BENDITT , 1961; SANDEBERG, 1963; KULONEN, 1965; SELYE et alii, 1969; VIZIOLI, 1971, 1973, 1975; FEHER et alii, 1971; VIZIOLI et alii, 1972; VIZIOLI & ALMEIDA, 1978) confirma esses dados. SCHMITT & BENEKE (1971) demonstraram que, 3 dias após implantação de esponja de poliester em ratos, há o aparecimento de fibras na periferia da esponja. Aos 5 dias, segundo os mesmos autores, podem-se reconhecer as fibras coradas com "van Gieson", como uma cápsula fibrosa que envolve a esponja.

Quanto à substância fundamental, formada principalmente por um mucopolissacarídeo ácido, o ácido hialurônico torna-se imprescindível à agregação do colágeno para formar fibras e feixes, atuando como substância "cimentante" , que une as fibrilas entre si.

A síntese dos mucopolissacarídeos ácidos (M.P.A.) no tecido de granulação tem sido pesquisada por inúmeros autores, utilizando-se de métodos histofotométricos e histoquímicos. Segundo FROMM (1958) e SCHILLING et alii (1959) a síntese de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação é muito rápida durante as primeiras duas ou três semanas. Mais recentemente, VIZIOLI (1975), utilizando-se da técnica histofotométrica para estudo da síntese de mucopolissacarídeos ácidos, constatou que nos processos de granulação provocados por implantação de esponja, a quantidade de M.P.A. existentes aumenta progressivamente durante o desenvolvimento do tecido, até atingir o período de 15 a 20 dias, decaindo posteriormente, o que confirma as pesquisas anteriores. Após

esse período de intensa atividade de síntese de M.P.A.,estes se ligam totalmente às fibras, agregando os feixes de colágeno e produzindo a maturação final do tecido.

No processo de formação do tecido de granulação, participam também algumas enzimas, como: fosfatase alcalina, adenosin-trifosfatase (ATPase) e 5-nucleotidase, que funcionam ativamente no processo de agregação das fibras de colágeno, sendo que essa participação atinge o máximo entre os 15 e 20 dias, com queda acentuada após esse período.

Após os 15 dias de desenvolvimento (GRINDLAY & WAUGH, 1951; DUNPHY & UDUPA, 1955; CHVAPIL, 1967; HICKS, 1969; FEHER et alii, 1971; VIZIOLI, 1971, 1973, 1975; FUKUHARA, 1972; PEDERSEN & VIIDIK, 1972) o tecidode granulação torna-se paulatinamente mais organizado e maduro, com a diminuição do número de células fibrogenéticas e de capilares, já que as necessidades de nutrição do tecido começam a diminuir, o que resulta num processo de "encolhimento" do tecido , provocando uma gradual retração da área. Isso, segundo VIZIOLI (1975), seria conseqüência de uma atividade colagenolítica, ou seja, de reabsorção do material fibroso produzido em excesso. Após 3 semanas, a reabsorção supera a síntese, e o tecido começa a "encolher". O encolhimento cessa após 5 semanas e, 45 dias depois, o local da ferida é quase imperceptível, a não ser pelo padrão diferente do tecido fibroso da área, que forma a cicatriz.

A neo-formação de capilares no tecido de granulação é bastante intensa durante os primeiros 15 dias, como é óbvio, por causa das necessidades do sangue do tecido em intensa atividade. Os capilares proliferam rapidamente,crescendo em direção à superfície do tecido, vindo das profundida-

des da lesão. Próximo à superfície, eles fazem um contorno , dobrando-se sobre si mesmos, e voltam em direção à profundidade. Isso confere à superfície do tecido um aspecto granulado (donde o nome "tecido de granulação") e vermelho intenso, que sangra ao menor toque. Conforme o tecido, o número de capilares diminui e a superfície fica menos granulada e mais pálida gradativamente, até que esse aspecto desaparece totalmente, dando lugar à cicatriz fibrosa.

Comentaram-se até aqui os estudos morfológicos inerentes à fase proliferativa do processo de reparo, os agentes responsáveis pela produção de reações granulomatosas, a origem e as funções dos fibroblastos, a síntese do colágeno, a síntese dos M.P.A. (mucopolissacarídeos ácidos), a participação de enzimas no tecido de granulação, a substância fundamental e a maturação do tecido.

Resta enfocar, agora, outro ponto de extrema importância: os fatores que interferem nesse processo de reparo. Vários autores têm dedicado suas pesquisas nesse sentido, procurando relacionar os fatores que atuam na velocidade de síntese de colágeno durante o processo de formação do tecido de granulação. Mc MINN & PRITCHARD (1969) relataram a idade, o estado nutricional do organismo, as variações de temperatura e o maior ou menor suprimento sangüíneo da região como fatores que interferem na cinética do processo de reparação tecidual de animais. HEUGHAM & HUNT (1975); COHEN et alii (1975), como também SCHILLING (1976), concordaram que substâncias como a Vitamina A, Vitamina C e o zinco aceleram o processo de reparação dos tecidos. Segundo HEUGHAM & HUNT (1975), a tensão do oxigênio tissular, o estado hemodinâmico do organismo e a ação de toxinas cumprem um papel preponde-

rante na biossíntese do tecido de granulação, ora acelerando a, ora retardando-a. A infiltração local de anestésicos, de acordo com BODVALL & RAIS (1962), retarda o processo de cura, principalmente quando contiverem vasoconstritores. DURIGHETTO JR. et alii (1978), trabalhando com ratos, concluiram que a corrente elétrica de baixa intensidade interfere no mecanismo de reparação do tecido, provocando aumento do edema, do infiltrado inflamatório e da quantidade de fibroblastos, na fase inicial, e antecipação da maturação do granuloma, na fase final do processo de cura.

Por outro lado, têm-se estudado os efeitos de drogas que interferem no metabolismo basal do organismo, ora acelerando-o (drogas anabolizantes), ora retardando-o (drogas catabolizantes), como as antinflamatórias (esteróides, enzimáticas, não esteróides e não enzimáticas), os hormônios, as vitaminas, o zinco, etc.

Recentemente, ANDRADE (1980) estudando a ação de três drogas antinflamatórias no tecido de granulação induzido em ratos, demonstrou que a dexametasona 21-fosfato é potente inibidora da síntese e maturação do colágeno, possuindo a fenilbutazona as mesmas propriedades, embora em grau menor. Por outro lado, a tripsina interferiu positivamente na síntese e maturação do colágeno, acelerando o processo de reparo.

Com base nesses estudos, e no fato de que certas drogas possuem a capacidade de acelerar a atividade metabólica (estimuladoras, portanto, do anabolismo do tecido de granulação), é que teve origem este trabalho. Entre essas drogas, estão a carnosina, o 2,4 dinitrofenol e a tiroxina.

A carnosina é um constituinte normal do organismo.

É um dipeptídeo descoberto em 1900 por GULEWITSCH & ADMIRADZIBI, procedente do extrato de carne, e é encontrado, em concentrações variáveis, em músculos estriados de vertebrados. Quimicamente, é a β-alanil L-histidina ($C_9H_{14}N_4O_3$), e seus efeitos são conhecidos como estimuladores do processo de reparação do tecido e junto ao metabolismo muscular, servindo como agente de transformação da miosina em actomiosina.

É recente a pesquisa dos efeitos da carnosina junto ao processo de reparação de tecidos. Autores como MUKADA et alii (1969); FUJII & COOK (1973); TSUNEO & NAGAI (1974) ; NAGAI & HIKOICHI (1974) têm investigado a ação da carnosina no reparo dos tecidos vitais. Para essas investigações,os autores utilizaram-se do tecido de granulação induzido em animais de laboratório. NAGAI (1975), utilizando-se também desse recurso, estudou, entre outras drogas, a carnosina, com suas relações químicas e fisiológicas no mecanismo de reparo dos tecidos. Os resultados revelaram que a substância atuava no crescimento e desenvolvimento do tecido de granulação.Por outro lado, VIZIOLI (1975) e VIZIOLI et alii (1976) confirmaram que, em condições normais, a biossíntese de colágeno e glicosaminoglicanas é acelerada para 2 semanas. Ainda VIZIOLI & ALMEIDA (1978), investigando os efeitos da carnosina no desenvolvimento do tecido de granulação por meio dos métodos histológicos e histofotométricos, demonstraram que o tecido tratado com carnosina se apresentou mais desenvolvido que o tecido controle, bem como apresentando aspectos morfológicos de maturação mais cedo do que o controle. Por fim, VIZIOLI et alii (1980), igualmente pesquisando os efeitos da carnosina sobre o desenvolvimento do tecido de granulação induzido por esponjas em ratos, relataram que, no tecido de granula-

ção tratado com carnosina,os fibroblastos apresentaram maior atividade nos primeiros 5 dias de desenvolvimento. Essa acelerada atividade de síntese foi maior após os 5 dias posteriores, e atingiu o máximo nos 10 dias de desenvolvimento. Após 15 dias, o ritmo dessa atividade começou a cair, e no 25º dia foi reduzida.

O 2,4 dinitrofenol é também conhecido como α-dinitrofenol $C_6H_3OH(NO_2)_2$, ou termol. Sua ação estimuladora sobre o metabolismo basal está sendo discutida desde os trabalhos de CUTTING & TAINTER (1932). Os primeiros autores estudaram efeitos farmacológicos e terapêuticos dessa droga, concluindo que ela induz um aumento de temperatura, uma estimulação respiratória e uma aceleração de quase 50% do metabolismo básico. Essa ativação metabólica produz uma grande quantidade de A.T.P., fornecendo a anergia necessária para os processos de síntese inerentes à reparação tecidual animal. Administrado por via oral, ao homem, na dose de 3 a 5mg/kg, o DNF determina elevação do metabolismo de 20 a 30% dentro de 1 hora, a qual perdura por 24 horas, caindo gradativamente dentro de 48 horas. A elevação do metabolismo é proporcional à dose e ao tempo de administração (CORBETT,1977).

Quanto à tiroxina, é o 3,3, 5,5 tetraiodotiroxina, um dos hormônios produzidos pela glândula tireóide. Ela sintetiza vários compostos orgânicos iodados, e exerce importantes atividades regulatórias no organismo, mediadas pelos seus produtos normais. Quando suficientemente prolongadas, as alterações mínimas da produção desses hormônios resultarão em alterações importantes no consumo de oxigênio, da função cardiovascular, do metabolismo do colesterol,da atividade neuromuscular e da função cerebral. Logo, as ações dos hormôni-

os da tireóide podem exercer as seguintes funções: termogêne se e termorregulação; metabolismo de lípides, proteínas e carboidratos; reprodução, crescimento e desenvolvimento; sis tema cardiovascular; mobilização de água e eletrólitos; sistema nervoso(GOTH, 1975).

Os hormônios tireoidianos (T_3 e T_4) funcionam como estimulantes gerais dos processos metabólicos. Em doses fisiológicas, os hormônios tireoidiais estimulam o metabolismo intermediário, originando o aumento do anabolismo. Ao contrário, em doses excessivas, induzem o catabolismo celular (BOWMAN et alii, 1970). O funcionamento da glândula tireóide é controlado pelo hormônio tireotrópico da adenohipófise - (TSH). A tiroxina é lentamente eliminada no organismo e abandona o sangue, com uma vida média de 6 a 7 dias (GOODMAN & GILMAN, 1978).

Existe uma grande semelhança entre as estruturas da tiroxina (T_4) e o 2,4 dinitrofenol (DNP), o clássico desacoplador específico da fosforilação mitocondrial oxidativa, sugerindo a esse hormônio propriedades estimulantes da taxa metabólica. E, realmente, tal condição já foi comprovada por diversos autores (LARDY & FELDOTT, 1951; NIEMEYER et alii, - 1953; HOTH & LIPMANN, 1954; MALEY, 1957).

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

É objeto do presente trabalho o efeito do 2,4 dinitrofenol, da carnosina e da tiroxina sobre o desenvolvimento do tecido de granulação, com o intuito de confirmar algumas assertivas já apresentadas, bem como esclarecer pontos ainda não elucidados. Propõe-se, pois:

1) acompanhar as etapas de formação do tecido de granulação, desde a sua gênese até sua maturação;

2) estudar, a nível histológico, os efeitos do 2,4 dinitrofenol, da carnosina e da tiroxina, comparando os resultados obtidos em termos de biossíntese e maturação do tecido de granulação;

3) confrontar os resultados obtidos nas proposições 1 e 2, procurando determinar as correlações entre o desenvolvimento normal do tecido de granulação e possíveis alterações desse tecido, quando submetido aos efeitos das drogas citadas no item 2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados 40 ratos adultos (Rattus norvegicus, Albinus, Wistar), de 150 dias, machos, pesando 250 a 280 g. Os ratos foram selecionados no momento do nascimento e, depois de desmamados, alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum". Completada a idade adequada, os animais foram submetidos cirurgicamente à implantação das esponjas.

3.2. EQUIPAMENTO E MATERIAL UTILIZADOS

- Mesa cirúrgica para ratos
- Campânula de vidro
- Tesouras de ponta fina e ponta romba
- Pinças diversas
- Porta-agulhas
- Agulhas de sutura

- Agulhas hipodérmicas descartáveis
- Placas de Petri
- Seringas centesimais de 1,0 ml - BD
- Esponjas de policlorovinil (PVC) 0,8cm x 0,8cm x 0,8cm
- Fios de algodão para sutura
- Algodão hidrófilo esterilizado
- Gaze esterilizada
- Solução antisséptica ("Germ-Hand, Darrow Laboratórios S/A")
- Éter sulfúrico ("Indafarma Indústria e Comércio Produtos Químicos")

3.3. IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

O material implantado foi esponja de policlorovinil (PVC). Fragmentos medindo 0,8cm x 0,8cm x 0,8cm, devidamente esterilizados, foram implantados subcutaneamente nos animais, conforme técnica a seguir: após anestesia com éter etílico, e utilizando-se campânula de vidro, depilou-se a região dorsal mediana traseira dos lados direito e esquerdo dos animais. Praticaram-se duas incisões de aproximadamente 2 cm de comprimento, paralelamente ao eixo da coluna vertebral. Em seguida, procedeu-se à divulsão dos tecidos, mediante auxílio de uma tesoura de ponta romba, para favorecer a introdução da esponja. Esta foi introduzida com uma pinça, subcutaneamente, o mais distante possível da incisão, procurando-se evitar que o processo de cicatrização atingisse o tecido de granulação em fase de desenvolvimento. Isso feito, a incisão foi suturada com dois pontos isolados.

Todos esses procedimentos foram conduzidos dentro de adequados padrões de assepsia.

3.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Quatro grupos de animais foram programados e assim distribuídos:

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	DROGA INJETADA	INJEÇÃO DIÁRIA
A	10	soro fisiológico	0,9mg/100g
B	10	carnosina	3mg/100g
C	10	2,4 dinitrofenol	5mg/100g
D	10	tiroxina	5µg/100g

GRUPO A - Grupo Controle. Imediatamente após a implantação da esponja de PVC, ou "tempo zero", passou a receber uma injeção intradérmica de soro fisiológico, diariamente.

GRUPO B - A partir do "tempo zero", recebeu uma injeção intradérmica de solução aquosa de carnosina (β-alanil L-histidina), na proporção de 3mg/100g de peso, diariamente.

GRUPO C - A partir do "tempo zero", recebeu uma injeção intradérmica de 2,4 dinitrofenol (α-dinitrofenol), na proporção de 5mg/100g de peso, diariamente.

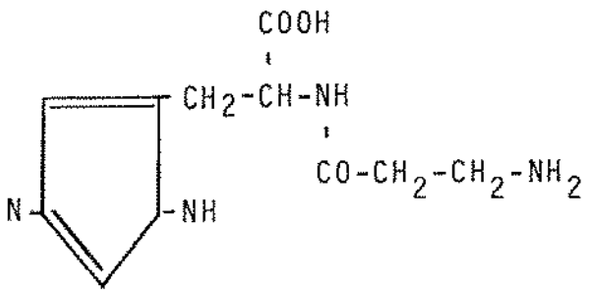
GRUPO D - A partir do "tempo zero", recebeu uma injeção intradérmica de solução aquosa de tiroxina(3, 3,5,5 tetraiodotiroxina), na proporção de 5 µg/100g de peso, diariamente.

3.5. DROGAS UTILIZADAS

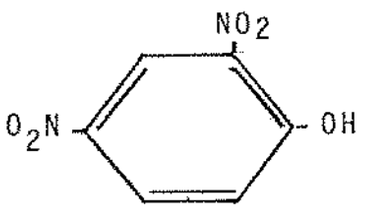
A pesquisa desenvolveu-se mediante aplicação das seguin

tes drogas:

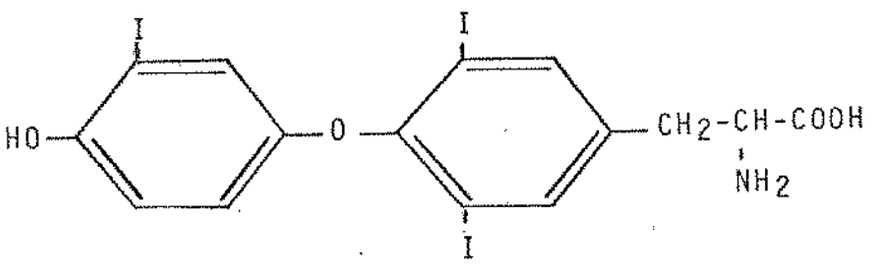
a) carnosina - É o β-alanil L-histidina, descoberto em 1900 por GULEWITSCH & ADMIRADZIBI em extrato de carne. Procedência: Japão - "Hamari Laboratories". Sua estrutura química é a seguinte:



b) 2,4 dinitrofenol - Também conhecido como α-dinitrofenol, ou termol. Procedência: Alemanha - "Merck". Sua fórmula estrutural é:



c) tiroxina - É o 3,3,5,5' tetraiodotiroxina. É um dos hormônios produzidos pela tireóide. Procedência: Estados Unidos - "Sigma Chemical Company". Sua estrutura química é:-



3.6. ESQUEMA DE SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram sacrificados pela inalação do éter etílico aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após o "tempo zero".

GRUPO	SACRIFÍCIOS				
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias
A	2	2	2	2	2
B	2	2	2	2	2
C	2	2	2	2	2
D	2	2	2	2	2

3.7. TÉCNICA DE LABORATÓRIO

Sacrificados os animais e retirados os tecidos de granulação, estes foram lavados rapidamente em solução fisiológica e fixados em formol neutro a 10% durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após fixação, os tecidos foram incluídos segundo a técnica de rotina, cortados na espessura de 7 micra e corados com hematoxilina-eosina.

3.8. OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS E DOCUMENTAÇÃO

Os estudos microscópicos de morfologia foram feitos com a ajuda do fotomicroscópio "ZEISS-POL", que também forneceu as fotomicrografias utilizadas para documentação dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

A esponja de PVC implantada subcutaneamente provoca uma reação inflamatória de corpo estranho, ocasionando a formação de uma cápsula fibrosa que circunscreve por completo a esponja. Em todos os grupos animais, constatou-se a presença dessa cápsula.

Partindo da cápsula fibrosa, os elementos celulares se dirigem pelos poros ao interior da esponja, onde iniciam sua proliferação.

A seqüência da proliferação do tecido de granulação, nos seus respectivos dias e grupos, é a seguinte:

A - GRUPO CONTROLE

5 dias:

Cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo to-

dos os limites da esponja de PVC. A partir da cápsula, o tecido de granulação começou a proliferar pela migração de inúmeros fibroblastos, oriundos de células totipotentes ou mesenquimais. Constatou-se, também, a presença de grande número de células mesenquimais, dando origem a angioblastos e expressivo número de capilares neoformados. Reduzido o número de células inflamatórias. Ausência de células na parte central da esponja. O aspecto geral do tecido de granulação de 5 dias pode ser observado na figura 1.A.

10 dias:

O tecido de granulação se estendeu a toda periferia da cápsula fibrosa, caminhando para o centro da esponja. Notou-se um bom espaço vazio na parte central do mesmo. A celularidade do tecido é grande, com proliferação de fibroblastos e angioblastos. Presença de capilares neoformados com circulação sanqüínea. Constatou-se, também, a formação incipiente de feixes e fibras colágenas. Ausência de células inflamatórias. O aspecto geral do tecido de 10 dias pode ser visto na figura 2.A.

15 dias:

Maior fibrosamento do tecido, com redução do número de fibroblastos. As partes periféricas apresentam-se mais fibrosas que as centrais. Pequena área central ainda não atingida pelo tecido, pois o tecido de granulação ocupou praticamente todos os espaços da esponja. Os vasos capilares se encontram totalmente formados. Ausência de angioblastos e presença de macrófagos. A evolução do tecido de 15 dias pode ser vista na figura 3.A.

20 dias:

O tecido de granulação atingiu todo o espaço da esponja, apresentando-se bem fibrosado, com feixes de fibras colágenas mais visíveis. A celularidade do tecido começou a diminuir. Evidente a presença de vasos, agora mais calibrosos. A evolução do tecido de granulação de 20 dias pode ser vista na figura 4.A.

25 dias:

O tecido de granulação se apresenta totalmente formado, e mostra feixes de fibras colágenas tomando os espaços da esponja. Acentuada redução de celularidade. O tecido de granulação de 25 dias pode ser observado na figura 5.A.

B - CARNOSINA

5 dias:

Cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo os limites da esponja de PVC, com maior número de fibroblastos em relação ao Grupo Controle mais células totipotentes e maior crescimento tecidual em relação ao controle. Reduzida quantidade de células inflamatórias, bem como ausência de tecido na parte central da esponja. Veja-se a figura 1.B.

10 dias:

Em geral, o tecido de granulação de 10 dias do Grupo B assemelha-se ao controle correspondente, excetuando- se o volume de células. O tecido estendeu-se a toda periferia da cápsula fibrosa, mas centralmente não se notou presença de células. A celularidade do tecido também é considerável, com inúmeros fibroblastos e angioblastos. De forma geral, o tecido está mais evoluído que o controle. O aspecto do teci-

do de 10 dias do Grupo B pode ser observado na figura 2.B.

15 dias:

Tecido de granulação ocupando praticamente todos os espaços da esponja. Tecido mais fibroso do que o correspondente ao controle. O aspecto do tecido de granulação de 15 dias do Grupo B pode ser observado na figura 3.B.

20 dias:

Também o tecido de granulação de 20 dias deste grupo corresponde ao Grupo Controle. Evidentes feixes de fibras colágenas, reduzida celularidade. A evolução de 20 dias pode ser vista na figura 4.B.

25 dias:

O tecido de granulação de 25 dias apresenta-se totalmente formado, à semelhança do controle correspondente. Veja-se o aspecto do tecido na figura 5.B.

C - 2,4 DINITROFENOL

5 dias:

Cápsula fibrosa mais delgada, mal delineada. Reduzido número de células mesenquimais, bem como de capilares neoformados. No interior da cápsula, não se constataram células e vasos. Presença de células inflamatórias e fibrina junto à cápsula. Houve inibição tecidual, em comparação com o Grupo Controle correspondente. A figura 1.C mostra esses detalhes.

10 dias:

Discreta formação de fibras na periferia da esponja. Cápsula fibrosa delgada. Ausência de células inflamatórias. Em comparação com o Grupo Controle, constatou-se redu-

ção de celularidade, fibrosamento e crescimento do tecido, ficando este com o quadro semelhante aos 5 dias de controle . Veja na figura 2.C o aqui descrito.

15 dias:

Observou-se, também, aos 15 dias, processo de inibição de crescimento do tecido. Entretanto, a diferença agora é maior em comparação ao Grupo Controle. Partes periféricas do tecido mais fibrosas que as centrais. Área central da esponja não atingida pelo novo tecido. Presença de vasos capilares. O aspecto geral do tecido de 15 dias pode ser observado na figura 3.C.

20 dias:

O tecido de granulação preencheu totalmente o espaço ocupado pela esponja. Mesmo assim, em relação ao controle, teve desenvolvimento ligeiramente menor. Reduzido número de células e presença de vasos. Veja-se na figura 4.C o que foi aqui descrito.

25 dias:

O tecido de granulação se apresenta totalmente formado, com nítida redução de celularidade. Percebeu-se que o tecido do Grupo Controle correspondente se apresenta mais organizado. Veja-se o aspecto do tecido na figura 5.C.

D - TIROXINA

5 dias:

Cápsula fibrosa delimitada, com presença de fibras e células na periferia. Constatou-se, igualmente, presença de células inflamatórias e capilares neoformados. Em relação

ao Grupo Controle, notou-se semelhança no desenvolvimento do tecido, embora a qualidade desse tecido fosse inferior ao controle no que diz respeito ao número de células e desenvolvimento de vasos. Em outras palavras, a evolução histológica do controle foi superior ao tecido tratado com tiroxina. Observe-se o aspecto do desenvolvimento do tecido de granulação de 5 dias na figura 1.D.

10 dias:

Semelhante ao desenvolvimento do tecido de granulação de 10 dias, em relação ao controle correspondente. Celularidade reduzida, ausência de células inflamatórias e poucos vasos. Parte central da esponja não atingida pelo tecido de granulação. A evolução desse tecido de granulação pode ser vista na figura 2.D.

15 dias:

Fibrosamento do tecido ligeiramente reduzido em relação ao Grupo Controle, apresentando celularidade reduzida em comparação ao controle respectivo. Em geral, o quadro aqui se aproxima ao do controle correspondente. Veja-se o aspecto do tecido na figura 3.D.

20 dias:

O tecido de granulação também ocupou todo o espaço da esponja. O controle mostra um tecido de granulação mais maduro em relação a este. Veja-se o tecido na figura 4.D.

25 dias:

Tecido de granulação totalmente formado, com ligeira diferença em relação ao controle, quanto ao aspecto de amadurecimento do tecido. Vejam-se na figura 5.D. esses aspectos.

4.2. MAPA DE ESTUDO COMPARATIVO

4.2. MAPA DE ESTUDO COMPARATIVO

DESENVOLVIMENTO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO					
DIAS	ESPECIFICAÇÃO	GRUPOS			
		CONTROLE	CARNOSINA	2,4 DINITROFENOL	TIROXINA
5	1. Cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo todos os limites da esponja implantada	Sim	Sim	Prejudicada	Sim
	2. Presença de fibroblastos e migração destes a partir da cápsula fibrosa	Normal	Superior ao controle	Inferior ao controle	Inferior ao controle
	3. Células totipotentes ou mesenquimais dando origem a capilares neoformados	Sim	Sim	Reduzidas	Inferior ao controle
	4. Ausência de tecido na parte central da esponja	Sim	Sim	Sim	Sim
	5. Evolução do tecido	Normal	Superior ao controle	Bastante reduzido	Ligeira redução
10	1. O tecido de granulação se estende a toda periferia da cápsula fibrosa, caminhando para o centro	Sim	Sim	Reduzido	Sim
	2. Celularidade	Normal	Grande	Reduzida	Reduzida
	3. Evolução do tecido	Normal	Grande	Bastante reduzida	Ligeiramente reduzida

(continua)

4.2. MAPA DE ESTUDO COMPARATIVO
(continuação)

DESENVOLVIMENTO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO					
DIAS	ESPECIFICAÇÃO	GRUPOS			
		CONTROLE	CARNOSINA	2,4 DINITROFENOL	TIROXINA
15	1. Maior fibrosamento do tecido com redução do número de fibroblastos	Sim	Sim	Reduzido	Ligeiramente reduzido
	2. Área central não atingida pelo novo tecido	Sim	Sim	Sim	Sim
	3. Celularidade	Normal	Normal	Muito pequena	Reduzida
	4. Evolução do tecido	Normal	Mais evoluido	Drástica redução	Ligeiramente reduzida
20	1. Celularidade	Reduzida	Reduzida	Reduzida	Reduzida
	2. Presença de vasos sangüíneos mais calibrosos	Sim	Sim	Sim	Sim
	3. Evolução do tecido	Normal	Normal	Reduzida	Ligeiramente reduzida
25	1. Tecido de granulação totalmente formado	Sim	Sim	Sim	Sim
	2. Evolução do tecido	Normal	Normal	Ligeiramente reduzida	Ligeiramente reduzida

4.3. LEGENDAS DAS FOTOMICROGRAFIAS

Coloração Hematoxilina-Eosina

GRUPO A - CONTROLE

GRUPO A - CONTROLE

FIGURA 1.A - Tecido de granulação, 5 dias. Cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo-se todos os limites da esponja implantada. Tecido bastante celularizado, capilares neoformados, reduzido número de células inflamatórias. O tecido de granulação começou a proliferar através da migração de inúmeros fibroblastos, provavelmente oriundos de células mesenquimais. Aumento original: 12X.

FIGURA 2.A - Tecido de granulação, 10 dias. O tecido de granulação se estendeu a toda a periferia da cápsula fibrosa. Observa-se que o centro da esponja ainda não foi preenchido pelo novo tecido em desenvolvimento. Celularidade continua acentuada. Formação incipiente de feixes de fibras colágenas. Aumento original: 12X.

FIGURA 3.A - 15 dias de evolução. Maior fibrosamento do tecido com redução do número de fibroblastos. Área central não atingida pelo tecido. Vasos capilares se encontram totalmente formados. Aumento original: 12X.

FIGURA 4.A - Tecido de granulação, 20 dias após a implantação. O tecido de granulação atingiu todo o espaço da esponja. A celularidade diminuiu e o tecido se apresenta bem fibrosado, com feixes de fibras colágenas mais visíveis. Evidente presença de vasos, agora mais calibrosos. Aumento original: 12X.

FIGURA 5.A - Tecido de granulação de 25 dias de evolução. Apresenta-se totalmente formado, mostrando feixes de fibras colágenas ocupando os espaços da esponja. Acentuada redução da celularidade. Aumento original: 12X.

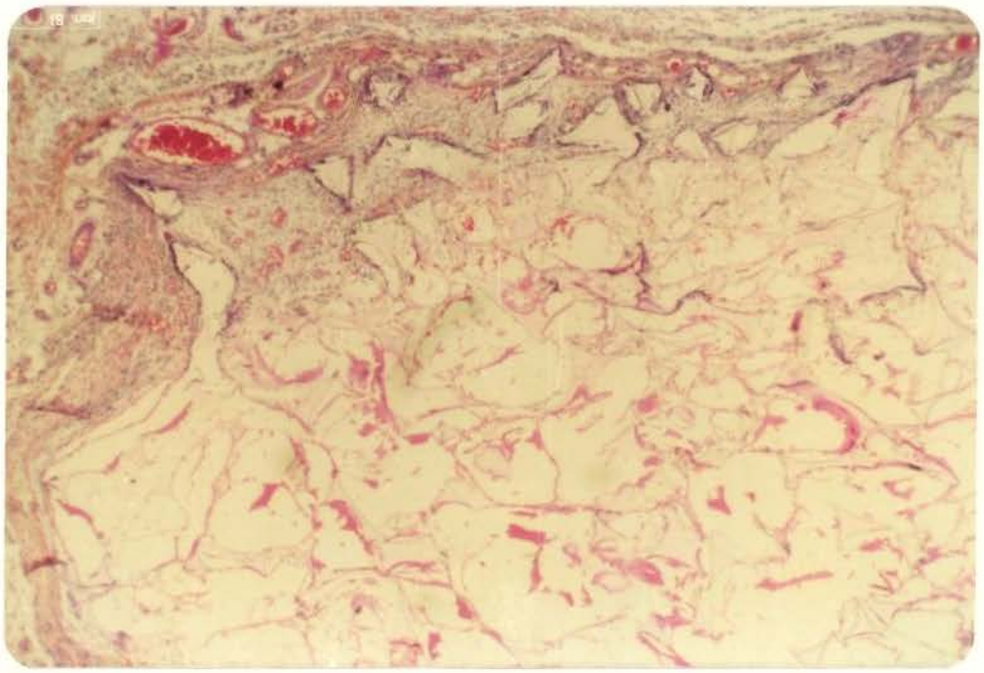


Figura 1.A - *Tecido de granulação aos 5 dias de desenvolvimento. Grupo A - Grupo Controle. Aumento original: 12X.*

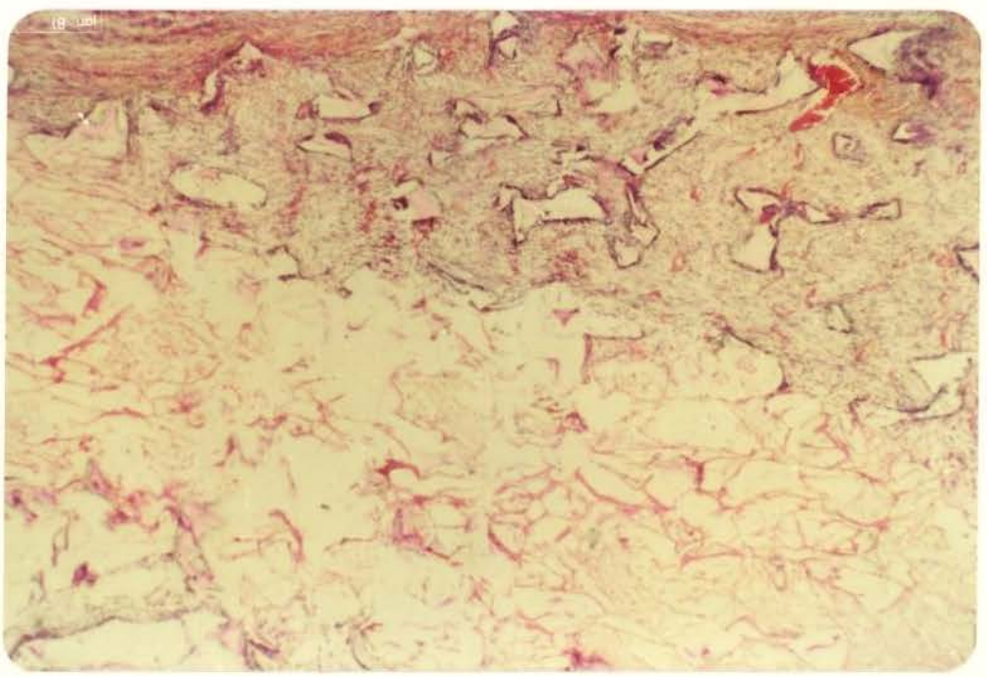


Figura 2.A - *Tecido de granulação aos 10 dias de desenvolvimento. Grupo A - Grupo Controle. Aumento original: 12X.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 3.A - *Tecido de granulação aos 15 dias de desenvolvimento. Grupo A - Grupo Controle. Aumento original: 12X.*

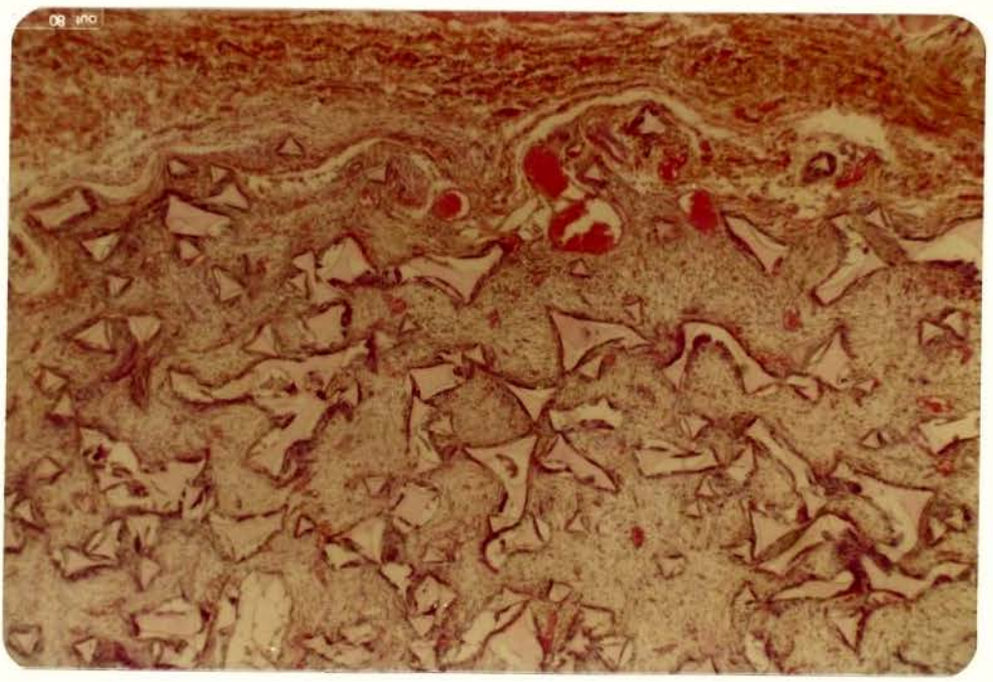


Figura 4.A - *Tecido de granulação aos 20 dias de desenvolvimento. Grupo A - Grupo Controle. Aumento original: 12X.*

Figura 5.A - *Tecido de granulação aos 25 dias de desenvolvimento. Grupo A - Grupo Controle. Aumento original: 12X.*

GRUPO B - CARNOSINA

GRUPO B - CARNOSINA

FIGURA 1.B - Tecido de granulação, 5 dias. Cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo todos os limites da esponja de PVC. Tecido bastante celularizado com inúmeros fibroblastos. Reduzido número de células inflamatórias. Capilares neoformados e ausência de tecido na parte central da esponja. Aumento original: 12X.

FIGURA 2.B - 10 dias de evolução. Observa-se que o tecido já se estendeu a toda a periferia da cápsula fibrosa. Centro da esponja ainda não atingido pelo tecido. A celularidade do tecido é grande, com inúmeros fibroblastos e angioblastos. Nota- se formação acentuada de feixes de fibras colágenas. Aumento original: 12X.

FIGURA 3.B - Tecido de granulação, 15 dias. O tecido, mais fibrosado, ocupou praticamente todos os espaços da esponja. Capilares totalmente formados. Aumento original: 12X.

FIGURA 4.B - 20 dias de evolução. O tecido de granulação atingiu todo o espaço da esponja. A celularidade diminuiu. O tecido apresenta-se bem fibrosado, com evidentes feixes de fibras colágenas em toto o campo. Aumento original: 12X.

FIGURA 5.B - Tecido de granulação de 25 dias. O tecido apresenta-se totalmente formado. Nítida redução da celularidade. A colagenização do tecido é completa. Aumento original: 12X.

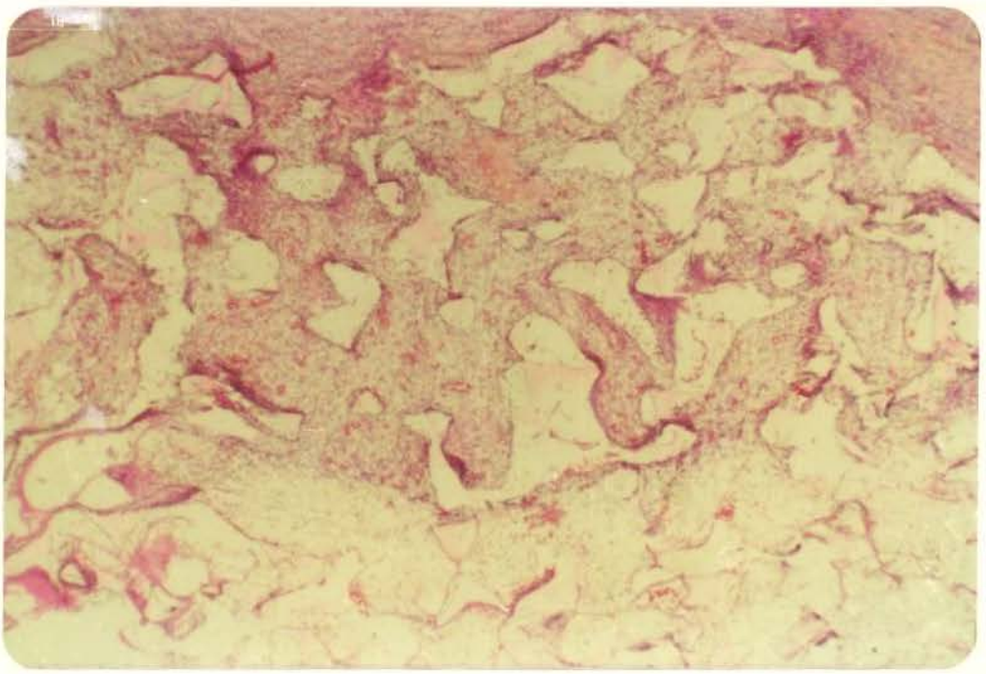


Figura 1.B - *Tecido de granulação aos 5 dias de desenvolvimento. Grupo B - tratado com carnosina. Aumento original: 12X.*

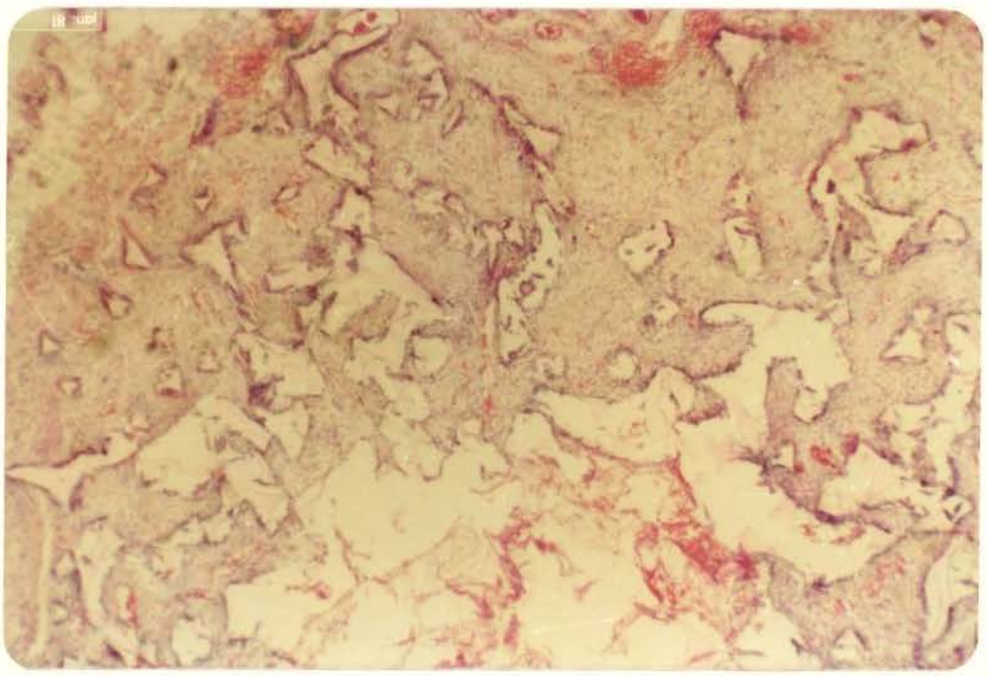


Figura 2.B - *Tecido de granulação aos 10 dias de desenvolvimento. Grupo B - tratado com carnosina. Aumento original: 12X.*

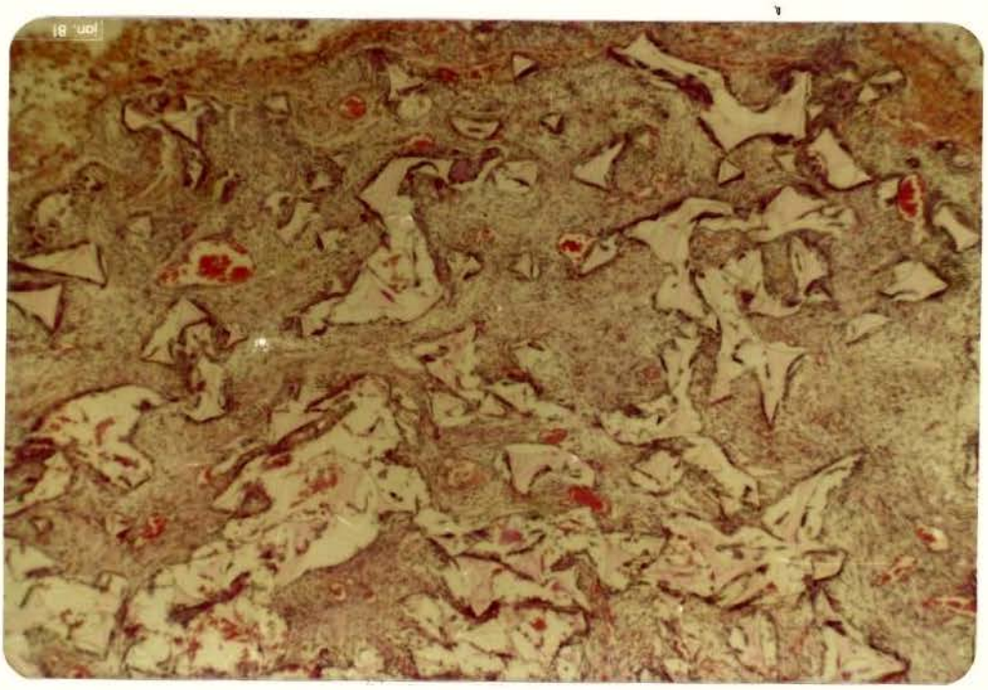


Figura 3.B - *Tecido de granulação aos 15 dias de desenvolvimento. Grupo B - tratado com carnosina. Aumento original: 12X.*

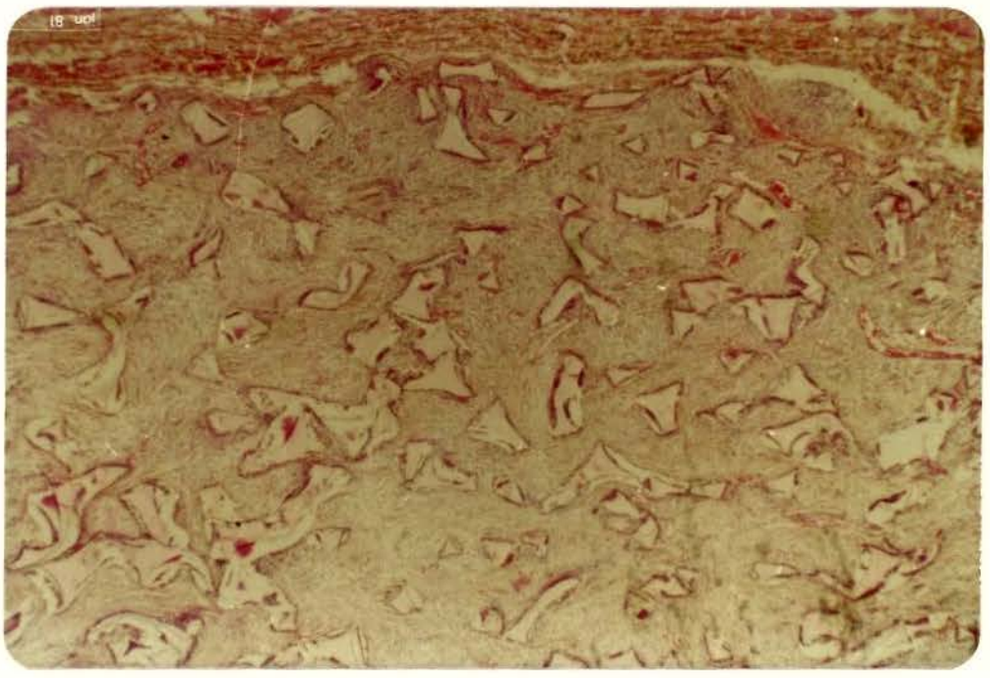


Figura 4.B - *Tecido de granulação aos 20 dias de desenvolvimento. Grupo B - tratado com carnosina. Aumento original: 12X.*

Figura 5.B - *Tecido de granulação aos 25 dias de desenvolvimento. Grupo B - tratado com carnosina. Aumento original: 12X.*

GRUPO C - 2,4 DINITROFENOL

GRUPO C - 2,4 DINITROFENOL

FIGURA 1.C - Tecido de granulação, 5 dias. Cápsula fibrosa mais delgada e visivelmente mal delineada.Observa-se o reduzido número de células mesenquimais, bem como de capilares neoformados. Presença de células inflamatórias e fibrina junto à cápsula. Quase completa ausência de tecido na esponja implantada. Aumento original: 12X.

FIGURA 2.C - Tecido de granulação, 10 dias. Discreta formação de tecido na periferia da esponja. Cápsula fibrosa delgada e ausência de células inflamatórias. Ausência de tecido no centro da esponja de PVC. Nota-se a presença de vasos capilares. Aumento original: 12X.

FIGURA 3.C - 15 dias de evolução do tecido. O tecido já se apresenta mais fibrosado de forma mais irregular. Celularidade muito reduzida. Nota-se a presença de vasos capilares. Aumento original: 12X.

FIGURA 4.C - 20 dias de evolução do tecido. O tecido de granulação atingiu quase completamente o espaço ocupado pela esponja. Reduzido número de células e presença de vasos capilares. Aumento original: 12X.

FIGURA 5.C - Tecido de granulação de 25 dias. O tecido preenche totalmente o espaço de esponja, mostrando feixes de fibras colágenas ainda não completamente organizados. Aumento original: 12X.

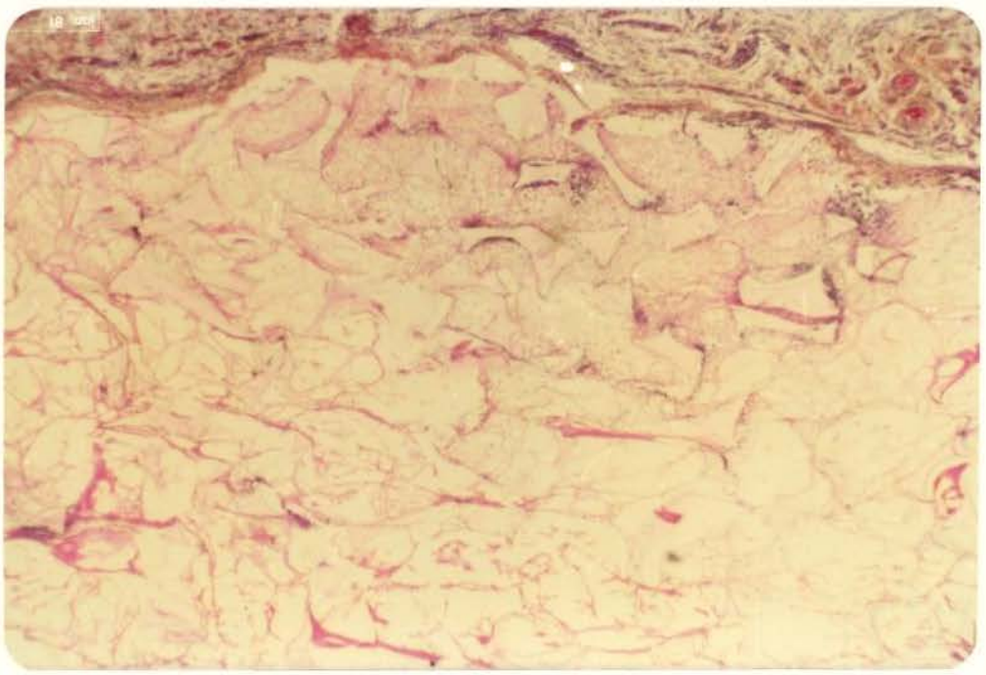


Figura 1.C - *Tecido de granulação aos 5 dias de desenvolvimento. Grupo C - tratado com 2,4 dinitrofenol. Aumento original: 12X.*

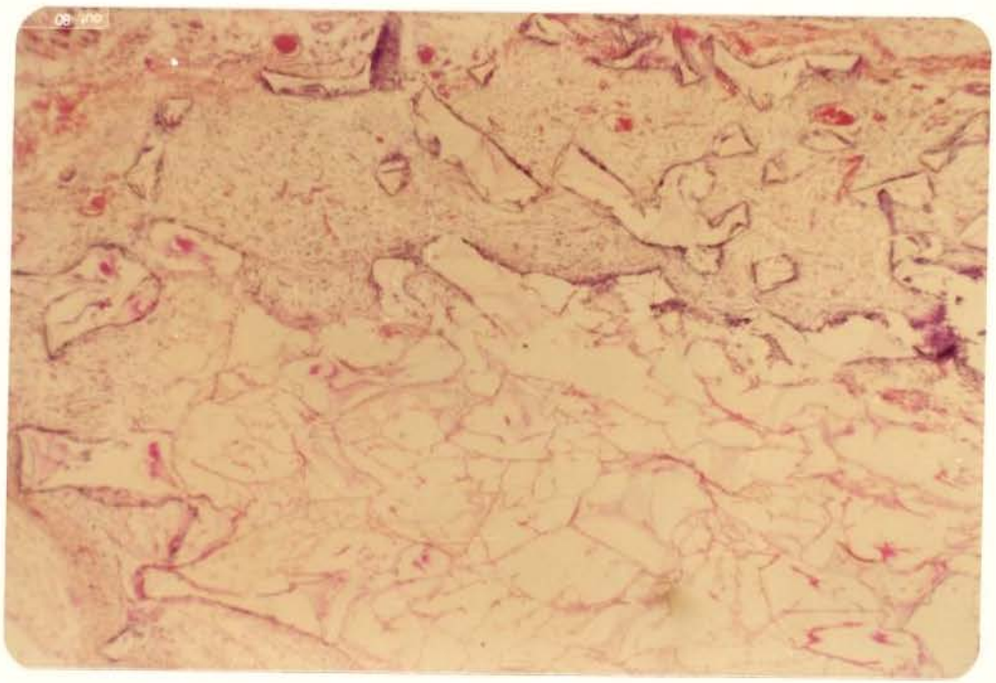


Figura 2.C - *Tecido de granulação aos 10 dias de desenvolvimento. Grupo C - tratado com 2,4 dinitrofenol. Aumento original: 12X.*

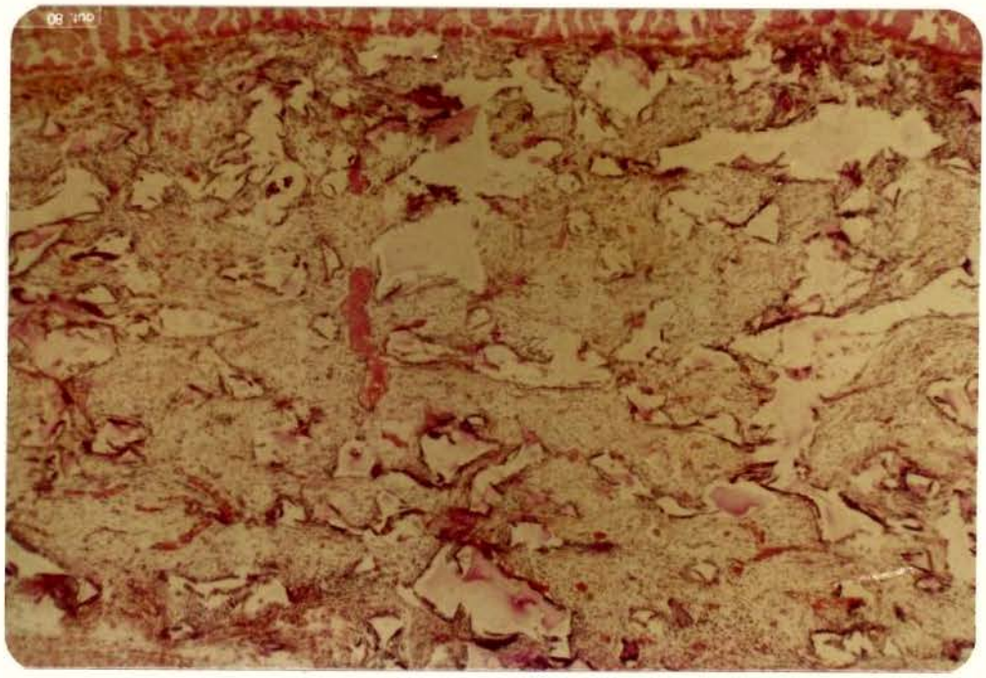


Figura 3.C - *Tecido de granulação aos 15 dias de desenvolvimento. Grupo C - tratado com 2,4 dinitrofenol. Aumento original: 12X.*

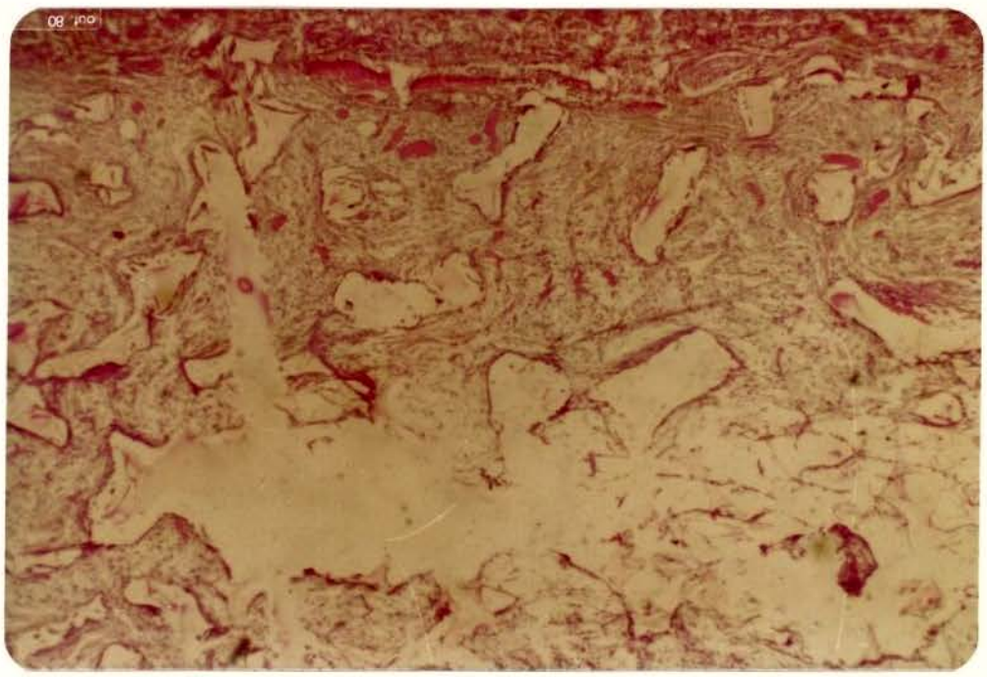


Figura 4.C - *Tecido de granulação aos 20 dias de desenvolvimento. Grupo C - tratado com 2,4 dinitrofenol. Aumento original: 12X.*

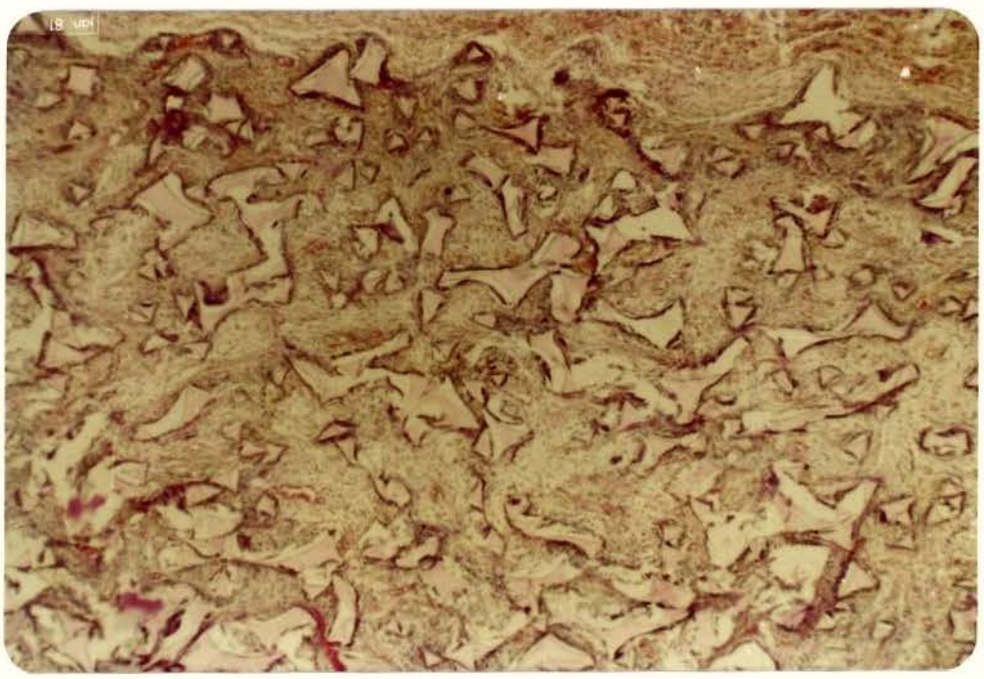


Figura 5.C - *Tecido de granulação aos 25 dias de desenvolvimento. Grupo C - tratado com 2,4 dinitrofenol. Aumento original: 12X.*

GRUPO D - TIROXINA

GRUPO D - TIROXINA

FIGURA 1.D - Tecido de granulação de 5 dias. Cápsula fibrosa bem delimitada. Nota-se a presença de células inflamatórias e capilares neoformados. Ausência de tecido na parte central da esponja. Aumento original: 12X.

FIGURA 2.D - Tecido de granulação de 10 dias. Observa-se celularidade reduzida, ausência de células inflamatórias. Início da formação de feixes de fibras colágenas. Parte central da esponja não atingida pelo tecido de granulação. Aumento original: 12X.

FIGURA 3.D - 15 dias de evolução. O tecido se apresenta mais fibrosado, com reduzida celularidade, não atingindo totalmente o centro da esponja. Capilares totalmente formados. Aumento original: 12X.

FIGURA 4.D - 20 dias de evolução. O tecido ocupou totalmente a esponja, com evidentes feixes de fibras colágenas. Reduzida celularidade. Aumento original: 12X.

FIGURA 5.D - Tecido de granulação, 25 dias. O tecido de granulação se encontra formado por completo, nítida redução da celularidade. Aumento original : 12X.

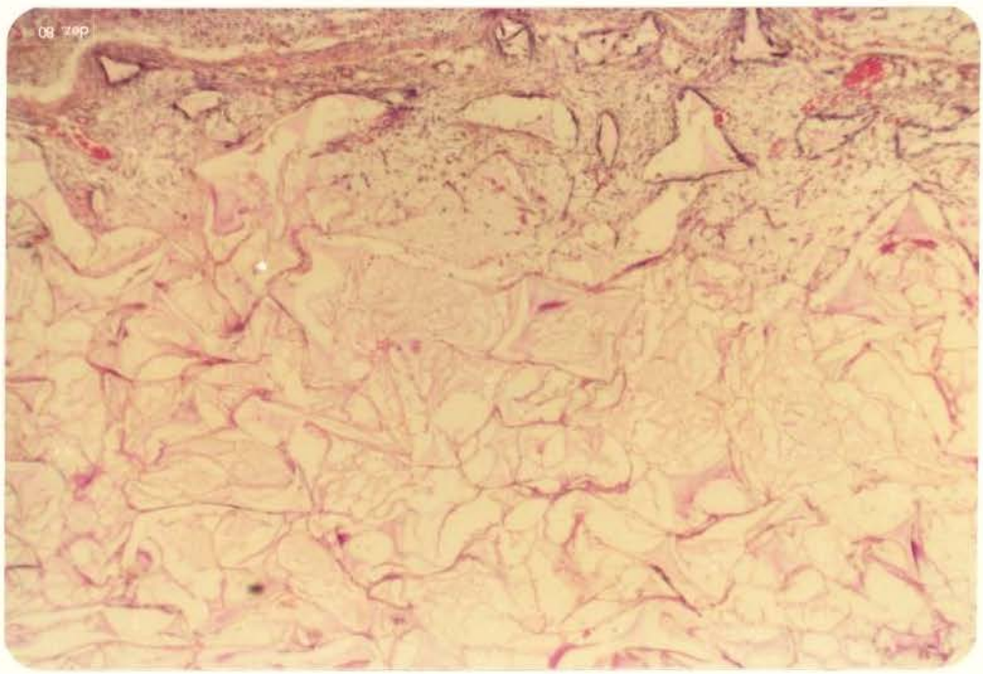


Figura 1.D - *Tecido de granulação aos 5 dias de desenvolvimento. Grupo D - tratado com tiroxina. Aumento original: 12X.*

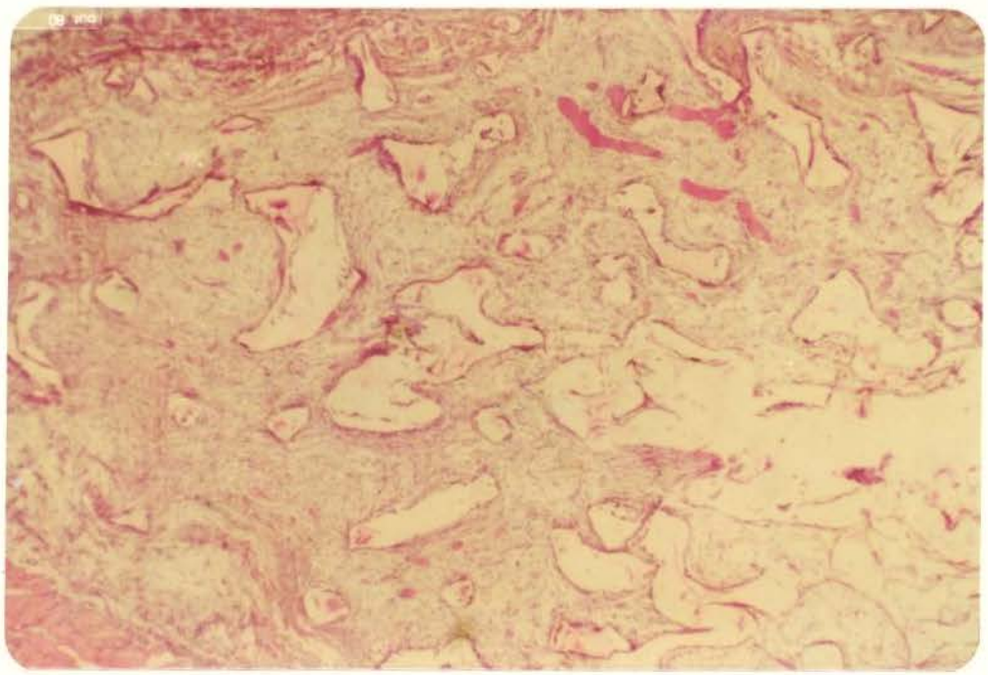


Figura 2.D - *Tecido de granulação aos 10 dias de desenvolvimento. Grupo D - tratado com tiroxina. Aumento original: 12X.*

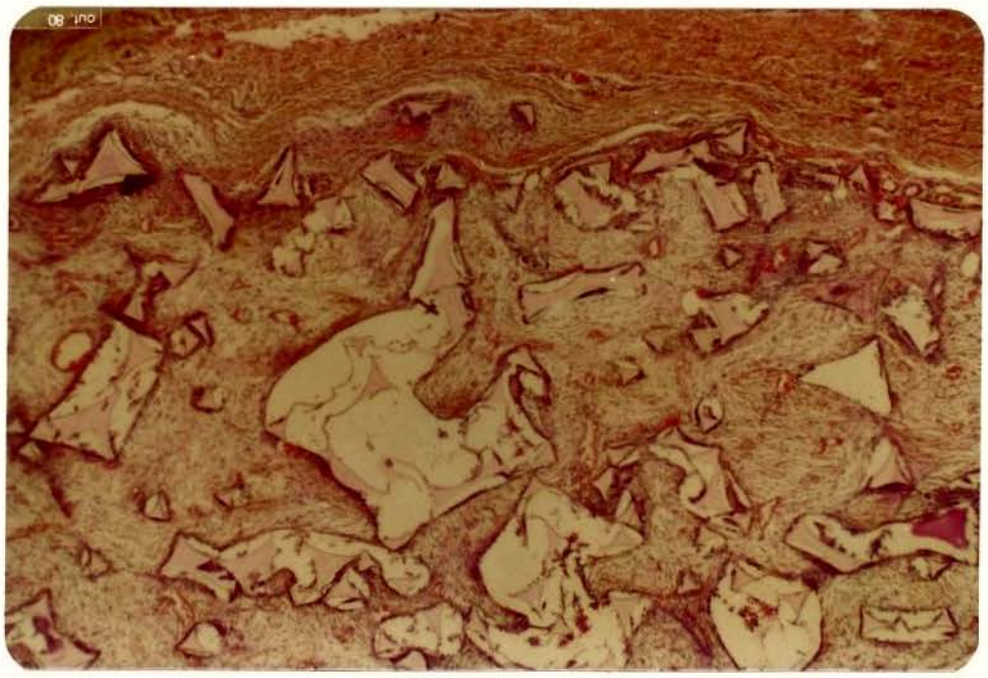


Figura 3.D - *Tecido de granulação aos 15 dias de desenvolvimento. Grupo D - tratado com tiroxina. Aumento original: 12X.*

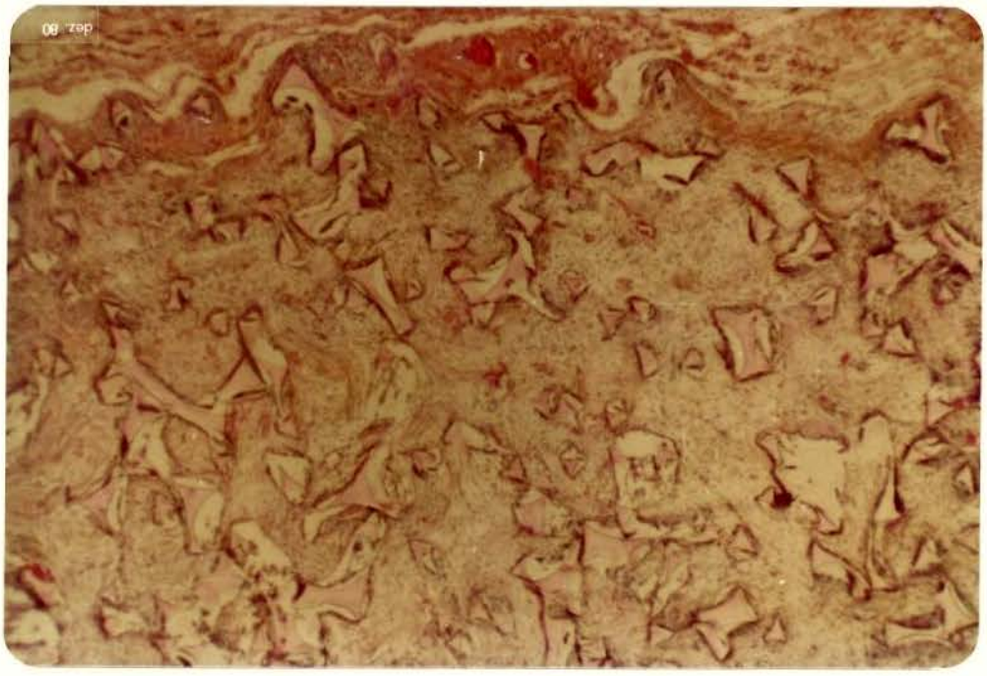


Figura 4.D - *Tecido de granulação aos 20 dias de desenvolvimento. Grupo D - tratado com tiroxina. Aumento original: 12X.*

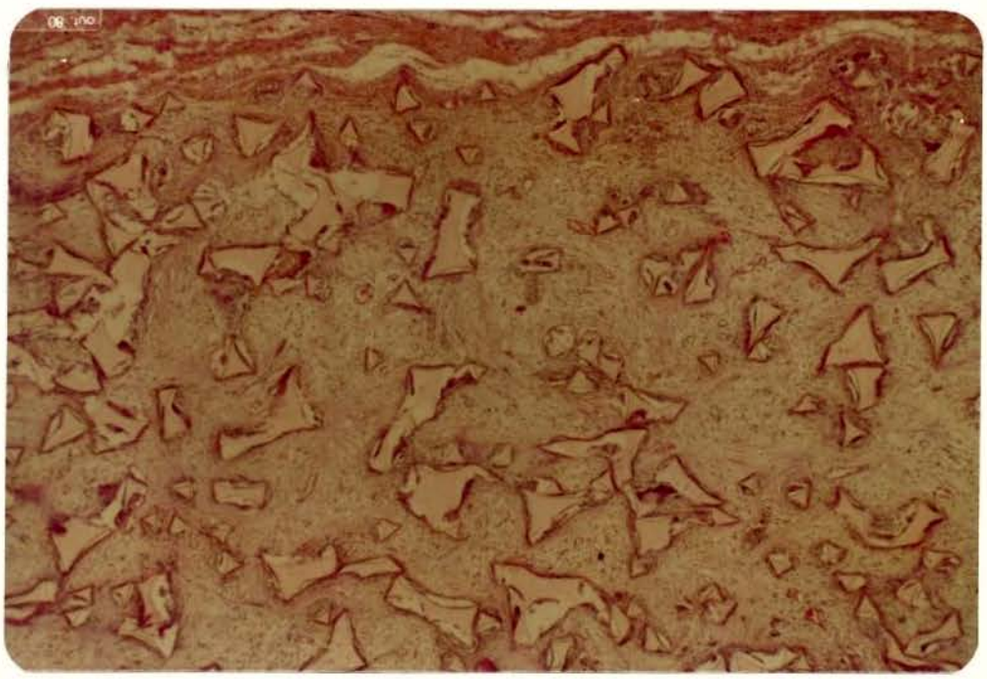


Figura 5.D - *Tecido de granulação aos 25 dias de desenvolvimento. Grupo D - tratado com tiroxina. Aumento original: 12X.*

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Como resultado da implantação da esponja de PVC, obteve-se, nos ratos do Grupo Controle, a formação do tecido de granulação. O seu início se deu em torno do 3º e 4º dias após implantação, possivelmente por migração de células fibrogenéticas e totipotentes a partir da cápsula fibrosa que envolve a esponja implantada.

A proliferação desses elementos celulares atingiu o máximo por volta de 15 a 20 dias de desenvolvimento do tecido. A partir daí, observou-se redução de celularidade e conseqüente estabelecimento da fase de organização e maturação tecidual, o que confirma os achados de GRINDLAY & WAUGH (1951); DUNPHY & UDUPA (1955); CHVAPIL (1967); HICKS (1969); FEHER et alli (1971); VIZIOLI (1971, 1973, 1980); PEDERSEN & VIIDIK (1972); FUKUHARA (1972); VIZIOLI & ALMEIDA (1978).

De um modo geral, de acordo com o descrito anteriormente, o comportamento dessas três fases não diferiu muito em relação aos quatro grupos estudados. Como será aborda-

do durante a discussão dos Grupos C e D, os tecidos obtidos dos animais que foram injetados com 2,4 dinitrofenol e carnosina apresentaram alterações histológicas evidentes.

Em todos os grupos, constatou-se que o tecido de granulação preenche os espaços da esponja de PVC em torno de 15-20 dias após a sua implantação. Aos 25 dias após implantação, o tecido apresenta-se organizado, embora com nítida redução de organização constatada no Grupo C. Ressalte-se que, nesta fase, a população celular se reduz bastante, confirmando pesquisas anteriores (CHVAPIL, 1967; Mc MINN, 1969; VIZIOLI, 1971, 1973, 1975; VIZIOLI & ALMEIDA, 1978; VIZIOLI et alli, 1980).

A proliferação do tecido de granulação se dá mais ativamente entre o período de 10 a 20 dias de desenvolvimento, período no qual os vasos neoformados intensificam sua função de nutrição, o que foi microscopicamente observado pela presença de hemácias em seu interior.

A partir dos resultados obtidos pelo estudo microscópico dos tecidos corados com hematoxilina-eosina, pode se levantar a seguinte discussão:

5.1. CARNOSINA

Aos 5 dias de desenvolvimento, observou-se uma cápsula fibrosa bem delineada, circunscrevendo os limites da esponja de PVC. Comparativamente ao Grupo Controle, constatou-se maior número de fibroblastos e células totipotentes. Evidenciou-se, ainda, que neste grupo o desenvolvimento do tecido foi maior do que aquele observado no Grupo Controle. Isto veio confirmar os trabalhos de VIZIOLI (1971, 1973, 1975) ; NAGAI (1975, 1978); VIZIOLI & ALMEIDA (1978); VIZIOLI et alli

(1980), de que a carnosina acelera o processo de evolução do tecido de granulação, revelando que nos 5 primeiros dias de desenvolvimento há maior atividade fibroblástica, com conseqüente formação de colágeno e maior número de vasos capilares.

Também aos 10 dias, o quadro histológico revelou que, no grupo tratado com carnosina, a celularidade e a evolução do tecido continuaram superiores ao Grupo Controle do mesmo período, embora a extensão do tecido de granulação tenha sido a mesma em ambos os grupos. Em termos comparativos, pode-se dizer que o desenvolvimento do tecido de granulação foi o dobro do controle, de aspecto mais fibroso, enquanto o controle se apresentou com menor número de fibras colágenas.

Nesta fase, até aos 15 dias, observou-se maior atividade dos fibroblastos, pelo maior desenvolvimento do tecido. Aos 15 dias, tem-se um tecido de granulação mais evoluído do que o controle. Aqui já não se nota muita diferença quanto ao número de células, e de um modo geral a extensão do tecido é a mesma em ambos os grupos. A partir dos 15 dias, o ritmo de atividade fibroblástica se reduz sensivelmente.

Aos 20 dias, o tecido tratado com carnosina se apresenta com aparência madura, bem organizado e com nítido fibrosamento aos 25 dias.

Os resultados conseguidos neste trabalho confirmaram as experiências de NAGAI (1975, 1978); VIZIOLI (1975); VIZIOLI et alli (1976); VIZIOLI & ALMEIDA (1978); VIZIOLI et alli (1980), de que o tecido de granulação, submetido à ação da carnosina, apresenta aspecto morfológico de maturação mais cedo que o normal, maior população de fibroblastos, ativação de células fibrogenéticas e maior formação de neocapilares.

Essas constatações nos fazem indagar a razão pela qual isto se dá. O mecanismo de ação da carnosina no processo de aceleração da cicatrização ainda não está completamente elucidado. A hipótese mais plausível a respeito do mecanismo de ação dos Ω-aminoácidos, a cujo grupo pertence a carnosina, foi desenvolvida por NAGAI (1975), que sugere para essas substâncias uma ação antinflamatória.

Essa ação antinflamatória reside nas propriedades antiedematosas dos Ω-aminoácidos, provavelmente em virtude da liberação de substâncias indutoras da resposta defensiva (SIRD). Assim, as propriedades estimulantes do tecido de granulação observadas na presente pesquisa, muito provavelmente se devem ao fato que, diminuindo o edema, principalmente nas duas primeiras semanas de desenvolvimento do tecido, a carnosina propicia melhores condições de evolução do tecido de granulação.

Essa hipótese é reforçada por VIZIOLI & ALMEIDA (1978), que afirmaram que a ação inibitória antiedematosa, promovida pela carnosina, é observada no fenômeno de Arthus, no choque anafilático, na anafilaxia local e outros fenômenos semelhantes, o que sugere uma ação antagonista à bradicinina e, conseqüentemente, contra o aumento de permeabilidade dos capilares do tecido e da pele.

VIZIOLI et alli (1980) constataram também um aumento na síntese de colágeno pelos fibroblastos do tecido tratado com carnosina, em relação ao Grupo Controle, através da radioautografia. Esse fato leva a supor que, além de uma ação antinflamatória, a carnosina teria também uma ação de estimulação da síntese proteica, que atinge seu ponto máximo aos 10 dias no tecido tratado, contra 15 dias do tecido controle.

Assim, é lícito supor-se que a ação estimulante da carnosina sobre a evolução do tecido de granulação se deva à ação combinada desses dois efeitos: um, diminuindo o edema inflamatório, e outro, estimulando a síntese proteica.

Com base nessas afirmações, e aceitando-se os mecanismos de ação aqui apontados para a carnosina, pode-se sugerir que a carnosina não deve ser empregada para estimular o processo de cura de feridas infectadas, desde que as suas propriedades antiedematosas contribuiriam para a deficiente dissolução das toxinas bacterianas, com conseqüente aumento da sua patogenicidade. A carnosina, pois, estaria indicada para estimular o processo de cura de feridas assépticas, onde não haveria o perigo acima mencionado.

5.2. 2,4 DINITROFENOL

O estudo microscópico do tecido de granulação tratado com 2,4 dinitrofenol aos 5 dias de evolução mostrou a cápsula fibrosa mais delgada, mal delineada. O número de células mesenquimais foi reduzido, o mesmo ocorrendo com o número de capilares neoformados. A evolução do tecido, aqui, revelou-se sensivelmente prejudicada. O quadro permite concluir que a ação do 2,4 dinitrofenol, ou termol, reduziu e inibiu o desenvolvimento do tecido de granulação.

Aos 10 dias de evolução, observa-se ainda nítida queda no desenvolvimento do tecido pela ação do 2,4 dinitrofenol, apresentando-se uma celularidade reduzida e um tecido pouco evoluído, além do fibrosamento deficiente. Esse fenômeno ocorreu exatamente no período onde se deveria ter maior atividade fibroblástica, como normalmente ocorre e foi demonstrado no Grupo Controle.

Continuou-se observando, aos 15 dias, inibição do processo de crescimento e desenvolvimento do tecido de granulação. A evolução do tecido permaneceu reduzida, em decorrência do menor fibrosamento e celularidade. Mesmo aos 20 dias, o tecido mostrou-se com desenvolvimento menor e aos 25 dias, um tecido menos organizado em relação ao controle.

Pode-se levantar alguns subsídios, com o intuito de esclarecer as alterações morfológicas observadas nos tecidos obtidos dos animais tratados com essa droga.

Uma das regras comuns na regulação metabólica é que as substâncias que estimulam as vias catabólicas, inibem as vias anabólicas. Em outras palavras, as drogas que estimulam a degradação inibem a síntese. Como o 2,4 dinitrofenol age como ativador das vias catabólicas (CUTTING & TAINTER , 1933; CUTTING et alli, 1933; BORLEY & TAINTER, 1937; BOWMAN et alli, 1970) é perfeitamente aceitável e lógico que ele iniba a via sintética necessária à evolução do tecido de granulação. O 2,4 dinitrofenol é um forte agente ATPásico, significando que os níveis de ATP se tornam bastante reduzidos, porque essa droga estimula a quebra do ATP, com conseqüente liberação de energia. Esse processo é altamente ativo a ponto de o ATP, sob certas condições, tornar-se esgotado como fonte energética, conseqüentemente inibindo os processos de síntese que dependam de energia. Tais assertivas vão de encontro às afirmações de EL-GUINDY (1972).

5.3. TIROXINA

Aos 5 dias de evolução dos tecidos, o estudo microscópico revelou uma cápsula delimitada,circunscrevendo os limites da esponja. Relativamente ao Grupo Controle, pode-se

dizer que se notou ligeira redução do número de fibroblastos e células totipotentes e mesenquimais.

Também aos 10 dias, observou-se menor desenvolvimento do tecido de granulação em relação ao controle. A mesma observação deve ser registrada aqui, análoga à descrita no Grupo C.

Já aos 15 dias, o tecido mostrou-se mais fibrosado, embora a celularidade e evolução tecidual permanecessem reduzidas em relação ao Grupo Controle. Aos 20 e 25 dias de desenvolvimento, os tecidos dos animais sob ação da tiroxina já se apresentam maduros, apesar de essa maturidade continuar discretamente inferior à dos tecidos do Grupo Controle.

Baseando-se no estudo da revisão bibliográfica realizada, esperava-se que a tiroxina funcionasse como estimulante do metabolismo intermediário, originando o aumento do anabolismo. Ao contrário, esperava-se que, em doses excessivas, não fisiológicas, induzisse o catabolismo celular. Tal expectativa tem origem nos trabalhos de BOWMAN et alli(1970) e INGBAR & WOEBER (1974) que, de maneira geral, chegaram a conclusão semelhante. Conforme se pode depreender dos resultados da presente pesquisa, a tiroxina produziu um efeito levemente inibitório da evolução do tecido de granulação,o que está em concordância com os trabalhos supracitados.

Pode-se sugerir que a tiroxina, na dose empregada na presente pesquisa (5µg/100g/dia), possuia uma atuação semelhante àquela descrita em relação ao 2,4 dinitrofenol, ou seja, ativando as vias catabólicas, inibindo, portanto, o anabolismo e, conseqüentemente, a síntese de substâncias necessárias a evolução do tecido de granulação em estudo;em outras palavras, a dosagem utilizada foi, provavelmente, farma

cológica e não fisiológica.

Um aspecto que não deve ser esquecido, ao comparar-se a atuação da tiroxina com o 2,4 dinitrofenol, é que a primeira droga é um hormônio tireoideano, cuja concentração, ação e metabolismo estão submetidos aos controles homeostáticos do organismo. Já o 2,4 dinitrofenol é uma droga alheia ao organismo, isto é, não existe previamente um sistema metabólico específico para essa substância. Isso parece justificar a diferença observada quanto ao grau de inibição provocado pelas distintas drogas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Baseados na discussão dos resultados ora apresentados, e considerando as condições de desenvolvimento do presente trabalho, conclui-se:

6.1. A carnosina, na dose de 3mg/100g/dia, participa como acelerador do processo de síntese e maturação do colágeno, interferindo positivamente na proliferação do tecido de granulação, tanto quantitativa quanto qualitativamente.

6.2. O 2,4 dinitrofenol, na dose de 5mg/100g/dia, interfere como potente inibidor do processo de síntese de colágeno durante o período de proliferação do tecido de granulação induzido artificialmente em ratos.

6.3. O hormônio tiroxina, na dose de 5µg/100g/dia, acarretou ligeira redução no processo de síntese e maturação do colágeno durante a formação do tecido de granulação induzido em ratos.

7. RESUMO

7. RESUMO

O presente trabalho se propôs a estudar o desenvolvimento do tecido de granulação induzido artificialmente em ratos, bem como os efeitos de drogas anabolizantes (2,4 dinitrofenol, carnosina e tiroxina) na evolução do tecido, durante o período de 25 dias.

Essas drogas foram injetadas subcutaneamente, diariamente, após a implantação das esponjas de PVC, nas seguintes proporções: 2,4 dinitrofenol (5mg/100g/peso), carnosina (3mg/100g/peso) e tiroxina (5µg/100g/peso). Os animais foram sacrificados aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias e forneceram material para observações microscópicas e fotomicrografias utilizadas para documentação dos resultados.

Os resultados conferidos pelo presente trabalho permitem concluir que o 2,4 dinitrofenol é um potente inibidor da síntese do colágeno. Constatou-se que essa droga reduz sensivelmente o número de células mesenquimais e de capilares. Como conseqüência, houve uma redução de desenvolvimen

to do tecido de granulação. A explicação para tal fato deve-se à propriedade do 2,4 dinitrofenol ser ativador das vias catabólicas, conseqüentemente, inibindo a síntese. A tiroxina acarretou ligeira queda da população de células mesenquimais e fibroblásticas, reduzido fibrosamento, conseqüentemente uma evolução discretamente menor do tecido de granulação. Sugere-se que a tiroxina, na dose empregada (5μ/100g/dia), possua um mecanismo de ação semelhante aquela descrita em relação ao 2,4 dinitrofenol, ou seja, inibindo o anabolismo. Por outro lado, o mesmo não ocorreu com a carnosina. Esta, confirmando vários trabalhos anteriores, acelerou o desenvolvimento do tecido de granulação, interferindo positivamente na proliferação do tecido, tanto quantitativa como qualitativamente, propiciando melhores condições de evolução tecidual.

A partir desses resultados, pode-se concluir que o 2,4 dinitrofenol não deve ser indicado para acelerar o processo de reparo dos tecidos. Nas condições da presente pesquisa, a tiroxina revelou-se ligeiramente inibidora do processo de reparo tecidual. Ao contrário, a carnosina mostrou-se aceleradora da atividade da fibrogênese no tecido de granulação.

SUMMARY

This research had the purpose to study the development of granulation tissue artificially induced in rats, as well as the effects of anabolic drugs (i.e., 2-4 dinitrophenol, carnosine and thyroxine) under the evolution of such a kind of tissue, during a period of 25 days.

These drugs were injected subcutaneously after PVC sponge implantation, in the following way: 2-4 dinitrophenol (5mg/100g daily); carnosine (3mg/100g daily) and thyroxine (5µg/100g daily). The animals were sacrificed at 5, 10, 15, 20 and 25 days after the sponge implantation and provided material for microscopic observations and photomicrographs that were utilized for the documentation of the results.

The results obtained by this study permit the conclusion that 2-4 dinitrophenol is a powerful inhibitor of the collagen synthesis. It was found that this drug greatly reduced the number of mesenquimal and of cells and of capilla-

ries. As a result, there was a reduction in the growth of granulation tissue. The explanation for this fact is the property of 2-4 dinitrophenol as an activator of the catabolic path ways and therefore an inhibitor of the synthesis. Thyroxine slightly reduced the population of mesenchimal and fibroblastic cells, therefore causing a slight decrease in the granulation tissue. It is suggested that thyroxine, in a 5µg/100g daily dose contains a type of action similar to that already described in relation to 2-4 dinitrophenol; that is, an inhibitor of anabolism. On the other hand, the same phenomenon did not occur with carnosine. This drug, confirming several other previous studies, increased the growth of granulation tissues and interfered positively in the proliferation of the tissue both quantitatively and qualitatively, providing better conditions for the tissue growth.

From these results it is possible to conclude that 2-4 dinitrophenol should not be indicated as an accelerator of the tissue-recuperation process. Under the research conditions of this study thyroxine has been revealed to be a slight inhibitor in the tissue-recuperation process. On the contrary, carnosine was revealed to be an accelerator of the fibrogenesis activity in the granulation tissue.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, E.D. Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias. Piracicaba, 1980. (Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia).

2. BODVALL, B. & RAIS, O. Effects of infiltration anaesthesia on the heling of incisions in traumatized and non-traumatized tissues. Acta chir. scand., 123: 83-91 , 1962.

3. BORLEY, W.E. & TAINTER, M.L. Effects of dinitrophenol on the permeability of the capsule of the lens. Arch. - Ophthal., 18: 908-11, 1937.

4. BOWMAN, W.C.; RAND, M.J.; WEST, G.B. Farmacologia. Barcelona, Ed. Jims, 1970. p. 353, 422, 430.

5. CHVAPIL, M. Physiology of connective tissue. London,Butterworths, 1967. p. 258-86.

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

7. CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p. 354-6.

8. CUTTING, W.C. & TAINTER, M.L. Actions of Dinitrophenol. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 29: 1268-9, 1932.

9. _____ & _____. Metabolic actionsof dinitrophenol. J. Am. med. Ass., 101 (27): 2099-102, 1933.

10. _____; MEHRTENS, H.G.; TAINTER, M.L. Actions and uses of dinitrophenol. J. Am. med. Ass., 101 (3): 193-5 , 1933.

11. DUNPHY, J.E. & UDUPA, K.N. Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New Engl. J. Med., 253: 847-52, 1955.

12. DURIGHETTO JR., A.F.; MATHEUS, G.; MARTINELLI, C. Efeitos da corrente elétrica contînua de baixa intensidade sobre o processo de reparo de feridas cutâneas de ratos. Estudo morfológico. Revta Ass. paul. Cirurg. dent., 32: 317-22, 1978.

13. EL-GUINDY, M.M. Mecanismo de ação do dinitrofenol na força de contração muscular. Campinas, 1972. {Tese (Doutoramento) - UNICAMP}.

14. FEHER, J.; JENNINGS, E.H.; RANNIE, I. Histological study of fibrogenesis in experimental inflammation with special reference to elastic tissue formation. Br.J. exp. Path., 52: 621-6, 1971.

15. FROMM, H.S. Distribution of sulfur in regenerating wound tissue. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97: 246-9, 1958.

16. FUJII, A. & COOK, E.S. Probiotcs. Antistaphylococcal - and antifibrinolytic activities of ω-Guanidoacyl - l-histidines. J. Med. Chem., 16: 1409-11, 1973.

17. FUKUHARA, M. Modifications of collagen and non fibrillar proteins and cathepsin activity in the carrageenin granuloma. Path. Biol., 20: 887-93, 1972.

18. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p. 1239-58.

19. GOTH, A. Hormônios da tireóide e drogas antitireoidianas. In: _____. Farmacologia médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1975. cap. 38, p. 459-66.

20. GOULD, B.S. Biosynthesis of collagen. III. The direct actions of ascorbic acid on hydroxyproline and collagen formation in subcutaneous polyvinyl sponge implants in guinea pig. J. biol. Chem., 232: 637-46 , 1958.

21. GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. Archs Surg., 63: 288-93, 1951.

22. GULEWITSCH & ADMIRADZIBI. Z. physiol. Chem., 30: 565 , 1900. Apud NAGAI, K., op. cit. ref. 39.

23. HAM, A.W. As células do tecido conjuntivo. In: _____. Histologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. cap. 9, p. 185.

24. HAUSMANN, E. & NEUMANN, W.F. Conversion of proline to hidroxyproline and its incorporation into collagen. J. biol. Chem., 236: 149-55, 1961.

25. HEUGHAM, C. & HUNT, T.K. Some aspects of wound healing research: a review. Can. J. Surg., 18: 118-25, 1975.

26. HICKS, R. The evalvation of inflammation induced by material implanted subcutaneously in the rat. J.Pharm. Pharmac., 21: 581-8, 1969.

27. HOTH, F.L. & LIPMANN, L. The uncoupling of respiration and phosphorylation bu thyroid hormones. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 40: 909-21, 1954.

28. INGBAR, S.H. & WOEBER, K.A. The thyroid gland. In: ____ & ____. Textbook of endocrinology. Philadelphia, Saunders, 1974. p. 95-232.

29. JACKSON, D.S. & BENTLEY, J.P. On the significance of the extractable collagens. J. biophys. biochem. Cytol., 7: 37-44, 1960.

30. JOHNSON, F.R. & Mc MINN, R.M.H. The association of alkaline phosphatase with fibrogenesis. J. Anat., 92: 544-50, 1958.

31. KULONEN, E. Research work on the structure and metabolism of collagen. Final report on the project UR-E8 - (60) - 3. Turku, Kirjapaino Polytipos, 1965.

32. LARDY, H.A. & FELDOTT, G. Metabolic effects of thyroxine in vitro. Ann. N.Y. Acad. Sci., 54: 636-48, 1951.

33. LOWTHER, D.A.; GREEN, N.M.; CHAPMAN, J.A. Morphological and chemical studies of collagen formation. II Metabolic activity of collagen associated with subcellular fractions of guinea pig granuloma. J. biophys. - biochem. Cytol., 10: 373-80, 1961.

34. 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, 1961.

35. MALEY, G.F. Comparison of some enzyme systems in normal and thyrotexic rat livers. Am. J. Physiol., 188: 35--9, 1957.

36. Mc MINN, R.M.H. Tissue repair. New York, Academic Press, 1969. p. 19.

37. Mc MINN, R.M.H. & PRITCHARD, J.J. Tissue repair. London, Academic Press, 1969. p. 14-40.

38. MUKADA, A.J.; NUTINI, L.G.; COOK, E.S. Prophylatic effect of γ-Aminobutylhistidine (Homocarnosine) on the experimental staphylococcal infection. Appl. Microbiol., 18 (4): 641-5, 1969.

39. NAGAI, K. Studies of carnosine and related chemicals on the physiology of wound repair mechanism. Tokyo, - School of Dentistry Nihon Univ. - Dep. Physiology , 1975.

40. _____ & HIKOICHI, S. A curative effect of carnosine (β-alanyl-l-histidine) on the decubital ulcer. J. - Nihon Univ. Sch. Dent., 16 (1): 23-8, 1974.

41. _____ & YAMANE, T. Pathophysiologische Bedeutung Von L-Carnosin Auf Die Wundheilung. Heterocycles, 10: 277-347, 1978.

42. NIEMEYER, H.; GRANE, R.W.; KENNEDY, P.; LIPMANN, F. Action of thyroids on oxygen consumption an phosphorylation by mitochondria isolated from rat liver. Boln - Soc. Biol. Santiago Chile, 10: 54-8, 1953.

43. PEDERSEN, P. & VIIDIK, A. Maturation of collagen in healing wounds in young and old rats. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 6: 16-23, 1972.

44. PROCKOP,J.; PETERKOFSKY, B.; UDENFRIEND, S. Studies on the intracellular localization of collagen synthesis in the intact chick embryo. J. biol. Chem., 237:1581 -6, 1962.

45. ROSS, R. & BENDITT, E.P. Wound healing and collagen formation. J. biophys. biochem. Cytol., 11: 677-82, 1961.

46. SANDEBERG, N. Experimental studies on wound healing. Sweden, Institute of Physiology and the Department of Surgery Univ. of Lund, 1963.

47. SCHILLING, J.A. Wound healing. Surg. Clins N. Am., 56: 859-73, 1976.

48. _____; JOEL, N.; SHURLEY, H.M. Wound healing: a comparative study of the histochemical changes in granulatio tissue contained in stainless steel wire mesh and polyvinyl sponge cylinders. Surgery, 46: 702-10, 1959.

49. SCHMITT, W. & BENEKE, G. Das bindegewebswachstum in subcutam implantien kunststoffschwammchen bei der ratte. Virchows Arch., B. Zellpath., 9: 218-34, 1971.

50. SELYE, H.; CUNNINGTON, J.; SOMOGYI, A.; CÔTÉ, G. Acceleration and inhibition of wound healing by topical treatment with different types of inflammatory irritants. Am. J. Surg., 177: 610-5, 1969.

51. STEIN, O. & WOLMAN, M. A histochemical study of wound healing in scorbutic guinea pigs. Br. J. exp. Path., 39: 418-23, 1958.

52. TSUNEO, S. & NAGAI, L. Local antiinflammatory effect of L.carnosine (β-alanil l histidine) associated with pains of post dental extraction. J. Nihon Univ. Sch. Dent., 16 (1): 18-22, 1974.

53. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge induced granulation tissue as revealed by dichroism. Acta anat., 80: 73-81, 1971.

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

55. _____. Relação entre fosfomonoesterases e a síntesede colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975. (Tese (Livre docência) - Faculdade de Odontologia).

56. VIZIOLI, M.R. & ALMEIDA, O.P. Effects of carnosine on the development of rat sponge-induced granulation I. general morphology and glycosaminoglycans histophotometry. Cell. molec. Biol., 23: 267-73, 1978.

57. _____ & EL-GUINDY, M.M. Histochemical investigation on adenosine - triphosphatase activity in rat sponge-induced granulation tissue. Annals Histochim., 21: 329-34, 1976.

58. _____; BLUMEN, G.; EL-GUINDY, M.M. Granulation tissue: histophometric and radioautographic observations on glycosaminoglycans and collagen synthesis and their relation with alkaline phosphatase. Annls Histochim., 21: 237-45, 1976.

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

60. _____; BLUMEN, G.; ALMEIDA, O.P.; MUNHOZ, C.O.G. Effects of carnosine on the development of rat sponge-induced granulation tissue. II. Histoautoradiographic observations on collagen biosynthesis. [No prelo].