

BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

**DESORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS FEIXES
DE COLAGENO SOB A INFLUÊNCIA DA HISTAMINA
- ESTUDO EXPERIMENTAL -**

ESTE TRABALHO SERIA APRESENTADO COMO TESE PARA CATEDRA, ENTRETANTO ÉSTES CONCURSOS FORAM SUSPENSOS.

PIRACICABA - S. P.
1967

BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

**DESORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS FEIXES
DE COLAGENO SOB A INFLUÊNCIA DA HISTAMINA
- ESTUDO EXPERIMENTAL -**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universi-
dade de Campinas, para concorrer ao
Cargo de Professor Titular da Cadeira
de Patologia.

PIRACICABA - S.P.

1967

**BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP**
**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

DEDICO ÊSTE TRABALHO

À minha espôsa Zeida Tanaka Vidal, companheira de todos os momentos, de cujo amor haurí o entusiasmo e o empenho para a carreira que venho seguindo.

Aos meus filhos Linus, Lineo e Lucio, o melhor que pude fazer até agora; que Deus vos dê melhores oportu
nidades.

**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Henrique Robertson Liberalli, de quem venho recebendo apôio e confiança desde 1958.

Ao Professor Assistente Dr. Lourenço Bozzo, que como meu assistente, contribuiu para a execução dêste trabalho.

Aos Cirurgiões Dentistas Clotildes Fernandes, Luiz Valdrighi e Mário Roberto Vizioli, instrutores da Cadeira que dirijo, e que também prestaram ajuda para esta pesquisa.

Ao Antonio Kerches de Campos, prático de laboratório, pela sua cooperação material indispensável.

**

HOMENAGEM

A Henoch U. Seabra Vidal, meu pai, exemplo, como meu avô, de trabalho, fibra, honestidade e dedicação.

Ao Professor Lucien Lison pelo seu tamanho científico, pela sua humanidade e compreensão.

Ao Professor Zeferino Vaz, Reitor da Universidade de Campinas, pela sua inteligência, seu porte de administrador e cientista.

**

ESCLARECIMENTO

Os tratamentos estatísticos desta pesquisa foram realizados pelo Professor Dr. Izaias Rangel Nogueira, Professor Associado da Cadeira de Matemática da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós" da U.S.P., e pelo economista Antonio Rocca, da Faculdade de Economia da U.S.P., aos quais somos gratos.

ÍNDICE

| | |
|--|--------|
| 1 - INTRODUÇÃO | pg. 8 |
| 2 - OBJETIVOS | pg. 14 |
| 3 - MATERIAL E MÉTODOS | pg. 14 |
| 3.1 - Técnica da aplicação da Histamina | pg. 14 |
| 3.2 - Remoção do tendão para estudo | pg. 14 |
| 3.3 - Fixação | pg. 15 |
| 3.4 - Inclusão e corte | pg. 15 |
| 3.5 - Técnicas de coloração histoquímica | pg. 15 |
| 3.6 - Técnicas histofísicas | pg. 16 |
| 4 - RESULTADOS | pg. 19 |
| 4.1 - Técnicas histoquímicas: Tendões normais - Azul de Toluidina | pg. 19 |
| 4.2 - Técnicas histoquímicas: Tendões injetados - Azul de toluidina | pg. 20 |
| 4.3 - Técnicas histoquímicas: Fluorescência | pg. 21 |
| 4.4 - Relação tempo-transformações nos tendões in jetados | pg. 21 |
| 4.5 - Fluorescência natural | pg. 22 |
| 5 - TÉCNICAS HISTOFÍSICAS | pg. 22 |
| 5.1 - Dicroísmo | pg. 22 |
| 5.2 - Birrefringência | pg. 23 |
| 5.3 - Resultados das medidas por interferência | pg. 33 |
| 6 - DISCUSSÃO | pg. 45 |
| 7 - CONCLUSÕES | pg. 74 |
| 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | pg. 77 |
| 9 - FOTOGRAFIAS | pg. 86 |

DESORGANIZAÇÃO MACROMOLECULAR DOS FEIXES DE COLÁGENO SOB A INFLUÊNCIA DA HISTAMINA

- Estudo Experimental -

1 - INTRODUÇÃO

A compreensão da história natural e da finalidade biológica da inflamação vêm requerendo pesquisas cada vez mais aprofundadas sobre o território, sede do processo. Indubitavelmente o tecido conjuntivo é o alvo mais importante dessas pesquisas. Nele ocorrem importantes modificações durante o processo inflamatório, sejam nas suas fibras, sejam nas suas células.

Com Lewis, segundo Willoughby (1964) e mesmo Florey (1958), começam as pesquisas para esclarecer o papel da histamina no processo inflamatório. Na publicação de Florey (1958) pode-se ler os resultados das experiências de Lewis sobre a aplicação da histamina em ante-braço e o conseqüente aparecimento da tríplice resposta. Rocha e Silva (1957), ao fazer uma revisão sobre a histamina, refere-se à sua síntese obtida em 1907, e às aquisições mais importantes até 1957, citando também Lewis. Neste trabalho, cumpre salientar, a ação vasodilatadora da histamina e o aumento de permeabilidade capilar são explicados por uma ação direta sobre o endotélio capilar; o autor não discute o mecanismo desta ação sobre o endotélio capilar.

No estudo da relação de causalidade entre histami

na e os fenômenos conjuntivo-vasculares do processo inflamatório empregaram-se anti-histamínicos e mesmo outras substâncias como a atropina e antiespasmódicos, Florey (1958), Willoughby e Spector (1964), Spector e Willoughby (1963), Beraldo e Rocha e Silva (1949). Dêstes trabalhos pode-se concluir que a histamina é responsável somente pelo início das modificações vasculares, sendo ponto pacífico que as injúrias libertam histamina no interior dos tecidos.

Os fenômenos alérgico-hiperérgicos, como liberadores de histamina foram muito estudados, certamente por sua importância clínica. Consequentemente, foi grande o número de pesquisas sobre a ação da reação antígeno-anticorpo como ativadora da anafilotoxina, e desta como liberadora de histamina.

Contudo, as relações entre a histamina e a estruturação do tecido conjuntivo não foram analisadas pelos autores, especialmente as transformações dos feixes de colágeno e da substância fundamental que os compõe, como parte importante das paredes vasculares.

Tanto é assim que, em mais recente publicação sobre o processo inflamatório, Rocha e Silva (1964) discute as idéias de Menkin, aborda o mecanismo da libertação da histamina, qualificando-o de complexo e não completamente esclarecido; relaciona, também, a participação da bradicinina com o aumento da permeabilidade vascular, contudo não se refere a uma possível modificação estrutural dos constituintes conjuntivos, nas áreas sedes da atividade dessas substâncias.

Sobre a participação dos mucopolissacarídeos da substância fundamental, Rocha e Silva (1954) considera-os possíveis ativadores da anafilotoxina, principalmente pela dessulfatação, quando são sulfatados.

Provavelmente esta é a mesma idéia citada por Heil

meyer e Kähler (1964) quando relata o comentário de Rocha e Silva sobre a possibilidade da existência de sulfatases nos tecidos; elas estariam relacionadas com o aumento da permeabilidade através da ativação da anafilotoxina pelos mucopolissacarídeos dessulfatados. Cabe aqui uma questão - como seriam ativadas as sulfatases?

Parece pois que, se é complexo o mecanismo da liberação da histamina, obscuras são ainda as modificações estruturais que se operam no tecido conjuntivo sob seu efeito.

Agora, sabe-se da presença de histamina nos tecidos de granulação e Burkhalter (1965) revê algumas pesquisas neste terreno. Contudo, Meyer, citado por Heilmeyer e Kähler (1964) nega que a histamina influa sobre a proliferação de granulomas, enquanto alguns autores relacionam a histamina com o crescimento e mesmo multiplicação celular, Mackay et alii (1961), Kahlson et alii (1962), Leblanc et alii (1962) e Burkhalter (1965).

Como agiria a histamina nestes fenômenos? Qual seria a sua atividade fisiológica junto às células do tecido conjuntivo? Poderíamos considerá-la uma substância hormonoide?

No que tange a influência da histamina sobre o tecido conjuntivo cumpre lembrar a hipótese de Riley (1962); pensa este autor que a histamina seria preparadora das células do tecido conjuntivo para receberem a heparina e metabolizá-la, fundamentando-se no fato de que tanto injeções de liberadores de histamina como as de mistura de heparina e histamina tornam as células mesenquimais intumescidas, granuladas, basófilas e amebóides. A formação de elementos da substância fundamental pode ser facilitada por este mecanismo, segundo Riley (1962).

Antecedendo-se a Riley (1962), Higginbotham (1959) mostra fatos relacionados com a hipótese acima exposta; com o uso de S³⁵ foi possível mostrar que os fibroblastos metabolizam heparina, fagocitando grânulos dos mastócitos. Este mesmo autor

apresenta um esquema metabólico, que provavelmente deve ter inspirado Riley (1962).

Mas qual o papel global desempenhado pela histamina desde a fase exudativa vascular, na qual predominam os fenômenos destrutivos, até a de proliferação (granulação) na qual predominam os de síntese?

Teria a histamina a função de uma substância "mensageira"?

É preciso salientar então, a idéia de que a histamina poderia ter, no início do processo inflamatório, a ação de uma mensagem que poria em funcionamento processos de remoção dos feixes de colágeno; talvez, em função da sua concentração, funcionem processos de substituição dos mesmos feixes.

Processos de destruição de colágeno existem em fenômenos inflamatórios e são relatados na bibliografia, v.g., por exemplo, Houck e Jacob (1961) afirmam: " A inflamação produz .. duas modificações químicas mais importantes, uma local e outra distante da região da injúria. Localmente há uma diminuição do colágeno dérmico insolúvel, aumento de hexosamina e de proteína não colagênica; distante do local da injúria há uma imediata que da de colágeno solúvel e insolúvel. Associa-se com estas modificações dérmicas um aumento de colágeno solúvel em citrato". O autor conclui que "The specificity of this loss in dermal collagen with local inflammation suggested the action of a dermal colagenase".

Com relação às transformações do colágeno, longe da região da injúria, os autores concluem que é devida a dois processos: - 1) degradação enzimica do colágeno insolúvel e, 2) tentativa de síntese de novo colágeno para substituir o que está sendo removido pela atividade enzimica.

Sethi e Houck (1961) analisando a resposta dérmica à injúria concluem: " decreases in insoluble dermal collagen in

injured skin distant from the site of local inflammation are a result of the specific response of this protein to injury rather than to some unic property of the inflammatory process itself". Porém, Houck e Jacob (1961) concluem " Therefore insoluble collagen is specifically decreased in response to local inflammation". Esta diminuição de colágeno é explicada pela ação de uma collagenase.

Houck (1962) empregando e relacionando técnicas de pesquisa semelhantes a seus métodos anteriores, conclui que a perda de colágeno é quantitativamente duplicada pela aplicação de esforços fracos na região não injuriada.

Houck et alii (1962), na mesma linha de pesquisas, estudaram a ação de álcalis e de ulcerações necróticas, mostrando os mesmos fenômenos já descritos.

Vidal (1963), analisando o mecanismo biológico da formação de bolsas periodontais, responsabiliza uma collagenase tecidual pela destruição do colágeno de sustentação do periodonto. Fullmer (1966) fundamentando-se nos trabalhos de Gross (1962) e utilizando seus métodos de pesquisa, comprova a existência de collagenase em gengivas inflamadas, relacionando êste achado com a destruição encontrada nas doenças periodontais, sendo de estranhar que não cite os trabalhos de Houck.

Ainda nesta linha de idéias, de que no processo inflamatório processam-se transformações de colágeno, encontra-se o trabalho de Morgan (1965), que pesquisando a interação corante-colágeno, conclui pela existência de um colágeno sem orientação molecular e, com um espiralamento mais frouxo. Êste autor não deixou de encarecer o papel dos produtos biológicos coexistentes no ambiente de formação das fibras de colágeno e no seu trabalho podemos ler: " Likewise, the accumulation or liberation of certain substances during inflammation could bring about structural alterations in intact fibers. Perhaps both me

chanisms are at work at the time, or one dominates in acute inflammation and the other chronic processes".

Dentro do campo de estudos da destruição dos feixes de colágeno em áreas de injúria, cumpre ainda salientar o trabalho de Vidal (1964). Nesta pesquisa o autor fundamentando-se em pesquisas suas, anteriormente publicadas, Vidal (1963) e Vidal (1964), estuda a organização macromolecular dos mucopolissacarídeos ácidos concluindo que nos feixes de colágeno em desagregação, tais compostos perdem a sua orientação macromolecular em relação às cadeias polipeptídicas de colágeno que só posteriormente apresentam desagregação macromolecular.

Neste trabalho em questão, o autor desta tese, propôs um esquema de regulagem e controle para os feixes, podendo-se ler neles: "Na dependência das variações de estímulos funcionais de natureza mecânica e bioquímica, estabelecem-se transformações locais (variações metabólicas, variação na concentração de mucopolissacarídeos ácidos e de precursores de colágeno) que agirão no sistema como um dispositivo de retroação; este dispositivo agirá nos fatores de entrada do sistema fibroblástico determinando modificações que manterão a homeostasia".

Frente a estímulos que rompem a homeostasia, tais como, processos inflamatórios, trauma, etc., as alterações biofísicas e bioquímicas locais, dentre as quais desagregação macromolecular de mucopolissacarídeos ácidos, colocarão em função, através do mesmo dispositivo de retroação, estímulos que redundarão em um mecanismo de eliminação e substituição de cadeias de colágeno.

Aquí cabe perguntar: qual a posição da histamina dentro deste esquema? Ou ainda, seria a histamina capaz de desencadear um processo de desagregação macromolecular de mucopolissacarídeos ácidos e de colágeno em algumas regiões de feixes de colágeno ou em todo o feixe?

Eppinger (1952) descreve fibras, que após a injeção de histamina, aparecem espessadas exibindo maior acidofilia; o que faz pensar em transformações macromoleculares ao nível dos feixes.

2 - OBJETIVOS

A presente pesquisa toma êste tema, desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina, para estudar as modificações morfológicas, histoquímicas e macromoleculares, encontradas nos feixes de colágeno ou em partes dêstes, quando é injetada histamina em seu derredor.

Discutir-se-ão os resultados em face dos conhecimentos atuais sôbre os feixes de colágeno, sua estrutura e sua biocibernética, uma vez que as transformações encontradas poderão refletir a influência da histamina no seu metabolismo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

GENERALIDADES :- Eram empregadas, nesta pesquisa, cobaias (*Cavia pocellus* L), tôdas machos e pesando em média ... 400 gr. Delas utilizavam-se os tendões calcaneares normais e tendões junto aos quais era feita uma aplicação de histamina.

3.1 - TÉCNICA DE APLICAÇÃO DA HISTAMINA:- Usava-se uma solução de histamina em sôro fisiológico, cada 0,25 de cc contendo 0,15 mg de histamina.

Era feita uma injeção hipodérmica de 0,25 cc junto ao tendão calcanear; a seringa usada era do tipo carpule e com agulha capilar "atraumática".

3.2 - REMOÇÃO DO TENDÃO PARA ESTUDO:- Após o animal ser sacrificado por meio de um golpe forte na região occipito

vertebral, o tendão calcanear era removido por inteiro cortando se suas extremidades de inserção.

Cada 30 minutos eram removidos, do animal sacrificado, o tendão normal e o "injetado", até 5 horas e 30 minutos.

3.3 - FIXAÇÃO :- As peças removidas eram fixadas por 24 horas em formol a 10%.

3.4 - INCLUSÃO E CORTE :- A inclusão era feita em parafina e o micrótomo era ajustado para se obterem cortes com 7 microns.

3.5 - TÉCNICA DE COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA:-

3.5.1 - Os cortes após hidratação eram corados pelo azul de toluidina, solução aquosa a 0,025%, tamponada para pH-4.

3.5.2 - Outra série de cortes era tratada por uma solução de corifosfina para mucopolissacarídeos ácidos segundo técnica (Vizioli-Vidal) (1966), para análise da fluorescência.

A técnica é a seguinte:- os cortes, depois de hidratados, eram cortados em uma solução aquosa de corifosfina . . 1/10.000 pH 2,5.

Esta técnica revela com muitos detalhes e precisão a presença de mucopolissacarídeos ácidos.

3.5.3 - Análise da fluorescência natural dos feixes de colágeno.

Os cortes eram desparafinados, secados e montados em óleo de parafina não fluorescente.

A observação microscópica era levada a efeito com o fotomicroscópio Zeiss, empregando-se o filtro excitador B.G. 3/4, que possui uma curva de transmissão que vai de 300 milimicrons a 400 milimicrons com uma parte de transmis-

são de 700 milimicrons. Como filtros de supressão empregou-se a combinação 50/41. O filtro 41 é livre de fluorescência intrínseca. Também era utilizado o microscópio Ortholux para fluorescência, usando-se como parte do equipamento os filtros: UG1, excitador e Euphos 2,5 mm de supressão.

3.6 - TÉCNICAS HISTOFÍSICAS:- foram feitos estudos de dicroísmo, mensurações de birrefringência, mensurações interferométricas de índices de refração e massa seca.

3.6.1 - DICROISMO:- Segundo técnica preconizada por Vidal (1963) (1964).

3.6.2 - MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA:- As medidas de birrefringência foram realizadas em 22 amostras sorteadas entre a população total de tendões normais. As amostras para medidas eram tomadas de tendões removidos após 30 minutos até 3 horas de aplicação histamínica.

De cada grupo de tendões provenientes de membros injetados sortearam-se de 16 a 18 amostras para leitura de birrefringência.

A técnica de medida da birrefringência foi a de Senarmont, isto é, pela rotação do analisador. O valor lido em graus foi transformado em milimicrons.

O aparelho usado foi o fotomicroscópio Zeiss Pol.

3.6.3 - MENSURAÇÕES POR INTERFERÊNCIA:- Procedeu-se às medidas de retardo óptico por interferometria, com o equipamento Zeiss para fotomicroscópio Pol.

Selecionavam-se, para medidas, regiões semelhantes àquelas que foram medidas em birrefringência. Mediam-se os retardos de 21 cortes de tendões normais e de 16 zonas de fragmentação e intumescimento de 16 cortes de tendões injetados.

O método de mensuração foi o de Senarmont.

Obtinha-se o máximo de escuro no campo que envolvia o setor do feixe a medir, pelo alargamento da franja escura central.

O brilho do feixe de colágeno a medir constrata va com o fundo negro do campo.

Pela rotação do analisador obtinha-se a inver são de brilho escuro, isto é, o campo passava a brilhar e o ob- jeto a escuro. Então fazia-se a leitura em graus que eram trans formados em milimicrons. - FIGS. 16 e 17.

Com os valores dos retardos ópticos calculados em milimicrons, calcularam-se os índices de refração e as massas sêcas, empregando-se as seguintes fórmulas.:

Para o cálculo dos índices de refração:-

$$N_o = \frac{RO}{e} + N_m$$

N_o = índice de refração procurado.

RO = retardo óptico encontrado, milimicrons.

e = espessura do corte, 7 microns, convertidos em milimicrons, 7000 milimicrons.

N_m = índice de refração do meio de embebição.

No presente trabalho empregou-se óleo de pa rafina cujo índice de refração por nós de terminado em refratômetro, segundo Abe, foi de 1.4827.

Desde que o feixe de colágeno é birrefringente, de terminaram-se os índices de refração na direção gama e alpha; aquela é a direção do maior índice de refração, paralela ao lôn go eixo do feixe, esta, perpendicular ao longo eixo do feixe e direção de menor índice de refração do feixe.

Escolhia-se como meio de embebição o óleo de para-

fina por ser mais próximo do provável índice de refração do feixe, desde que de um lado o retardo óptico a ser lido não fosse grande demais, escapando, destarte, às possibilidades de mensuração pelo método de Senarmont, e, de outro lado, os índices em contrados seriam os mais vizinhos do índice molecular do colágeno.

As amostras, tanto para as medidas de birrefringência como para as de interferência, tinham tamanhos diferentes em consequência do preparo que os cortes requeriam.

A massa seca era calculada usando-se a seguinte equação:-

$$M = \frac{A \cdot RO}{100 \alpha} + (n_m + n_a) \cdot \frac{Ae}{100}$$

M = massa seca total.

A = área na qual foi lido o retardo óptico
 $2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$

RO = retardo óptico em milimicrons.

α = aumento específico do índice de refração, o aumento usado na generalidade dos casos é de 0,0018.

n_m = índice de refração do meio de embebição, 1,4827

n_a = índice de refração da água, 1,3330

e = espessura do espécimen, 7×10^3 milimicrons. ($7 \cdot 10^{-4} \text{ cm.}$)

3.6.4 - NOTAS ESPECIAIS SÔBRE AS MEDIDAS

As medidas de retardo óptico da birrefringência eram feitas nos tendões normais, em tôda a extensão dos feixes. Ainda com relação aos feixes normais, as medidas de interferência foram executadas em uma área restrita. Esta área era obtida seccionando-se os feixes com uma navalha; assim preparadas, as

partes dos feixes destinados às mensurações mantinham um íntimo contacto com o meio de embebição, não formavam imagem "fantasma" e permitiam uma orientação adequada com relação ao raio de mensuração.

Antes de serem os feixes de colágeno preparados para as medidas de interferência foram também submetidos à observações qualitativas com luz policromática.

Os feixes de colágeno submetidos à ação da histamina deveriam apresentar modificações. As zonas transformadas eram submetidas às mensurações de birrefringência e interferometria.

4 - RESULTADOS

4.1 - TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS: TENDÕES NORMAIS AZUL DE TOLUIDINA

Os tendões normais apresentavam-se quase uniformemente corados; em algumas zonas notava-se uma afinidade ligeiramente mais acentuada. A cor era metacromática discreta:

Constatava-se a presença de fibrócitos e fibroblastos entre os componentes fibrosos do feixe. Nestas zonas havia u'a maior metacromasia.

É muito difícil a diferenciação do citoplasma destas células. Raramente se podia observar fibroblastos com citoplasma bem nítido e metacromático.

FLUORESCÊNCIA COM CORIFOSFINA

Os tendões normais submetidos a esta técnica mostravam os aspectos morfológicos já por demais conhecidos.

Cumprе salientar que os núcleos eram mais notáveis exibindo uma fluorescência alaranjada.

As fibras do feixe eram de uma fluorescência verde.

de nítida; entre elas, via-se um maior acúmulo de fluorescência alaranjada, mais ou menos filiforme.

Os feixes corados com a solução de pH 4, apesar de sua fluorescência verde, mostravam também uma tonalidade alaranjada fraca que, com coloração por solução de pH 2,5, desaparecia totalmente, ficando visível em alaranjado somente os núcleos e, muito raramente, o citoplasma de algum fibroblasto.

4.2 - TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS: TENDÕES INJETADOS AZUL DE TOLUIDINA

A mais importante modificação notada foi a presença de descontinuidades nos feixes de colágeno, com aparecimento de zonas de fragmentação nos feixes.

As fibras dos feixes comprometidos apresentavam-se separadas. O feixe, na zona fragmentada, apresentava-se ora mais ora menos intumescido. - FIGS. 1 e 9 -

De maneira geral, os feixes, no corte histológico, mostravam maior metacromasia que os feixes normais.

Aparentemente havia um aumento de celularidade nos tendões tratados pela histamina.

Podia-se constatar um aumento de células de aspecto fibroblástico. Os citoplasmas eram em geral mais nítidos, apresentando u'a metacromasia de intensidade variável.

Via-se a presença de células com núcleos fusiformes tendendo para ovóide e outras de aspecto condróide. FIG.2.

Êstes aspectos davam a impressão de terem os fibroblastos sofrido um intumescimento. Havia no citoplasma destas células material metacromático.

É preciso salientar que êstes aspectos descritos, não estavam presentes em todos os feixes componentes do corte histológico. Via-se a presença de muitos feixes normais.

4.3 - TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS: FLUORESCÊNCIA

4.3.1 - FLUORESCÊNCIA EM CORTES CORADOS PELA CORIFOSFINA -

Os aspectos morfológicos nos cortes corados pela corifosfina, em solução de pH 4, apresentavam as mesmas características dos cortes corados pelo azul de toluidina e já descritos.

Evidenciava-se uma coloração fluorescente alaranjada mais forte que nos feixes de tendão normal, principalmente nas zonas de fragmentação. - FIG. 3 -

Os aspectos citológicos, já descritos, eram bem mais evidentes, divisando-se a fluorescência alaranjada no citoplasma das células. - FIG. 4 - Podia-se constatar a presença de mastócitos junto aos vasos.

A coloração com solução de pH 2,5 não exibia a coloração alaranjada dos feixes. Passava a predominar o verde das fibras.

A presença de mastócitos tornou-se bem evidente, parecendo que, em relação aos tendões normais, os tendões após a injeção de histamina apresentavam maior número destas células.

As células fibroblásticas continuavam com seus citoplasmas alaranjado-fluorescentes. - FIG. 5 -

4.4. - RELAÇÃO TEMPO-TRANSFORMAÇÕES, NOS TENDÕES INJETADOS -

Os cortes de tendões aos 30 minutos após a injeção eram os que exibiam, aparentemente, maior intensidade de transformações descritas. Contudo a diferença em relação aos demais não permite uma afirmação categórica.

O exame histológico dos cortes não permitiu estabe

lecer diferenças entre os grupos. Todos apresentavam alguns feixes comprometidos.

4.5 - FLUORESCÊNCIA NATURAL -

Os cortes histológicos de tendões normais apresentavam fluorescência.

Histologicamente estes cortes eram compactos, homogêneos, sendo que assim se apresenta a fluorescência natural que é de cor esverdeada clara com a combinação de filtros do fotomicroscópio Zeiss. - FIG. 6 -

Exames realizados no microscópio Ortholux com filtro excitador UG-1 e filtro de barreira Euphos 2,5 mm dão uma fluorescência azulada mais forte, mas o fundo apresenta uma luminosidade fraca.

O termo homogêneo é usado aqui em relação ao feixe de colágeno mas não à fluorescência: esta tinha uma distribuição irregular e as diferenças não eram muito acentuadas.

FIG. 6 -

Os tendões injetados deram cortes histológicos nos quais podia-se ver as alterações morfológicas já descritas.

A fluorescência natural presente era de maneira geral mais forte.

As zonas de fragmentação, intumescimento e formação de grumos foram mais fortemente fluorescentes. FIGS. 7 e 8.

Havia feixes que se apresentavam mais alargados e menos fluorescentes.

5 - TÉCNICAS HISTOFÍSICAS

5.1 - DICROÍSMO

O dicroísmo levado a efeito como já foi descrito anteriormente, Vidal (1963) (1964), era observado nos cortes de

tendões normais.

5.1.1 - TENDÕES INJETADOS

Nas regiões de intumescimento, fragmentação e formação de grumos havia uma diminuição sensível do dicroísmo. Era difícil constatar-se um desaparecimento total do dicroísmo. Se não era possível a afirmação de que havia ausência de dicroísmo em tais partes dos feixes de colágeno afetados, dos tendões injetados, é possível se dizer que o mesmo diminui consideravelmente. FIG. 9 -

Não foi possível estabelecer uma relação do tempo de injeção e remoção dos tendões injetados com a diminuição do dicroísmo.

5.2 - BIRREFRINGÊNCIA

As medidas de birrefringência serão apresentadas em tabelas e histogramas. Serão apresentados os dados sem o resultado do tratamento estatístico, em seguida os histogramas e depois os resultados dos tratamentos estatísticos. Os histogramas podem ser vistos nas figuras 13 e 14.

O padrão normal apresentava ao microscópio de polarização, um aspecto homogêneo compacto das fibras birrefringentes. FIG. 10 - Os feixes dos tendões injetados, como já foi descrito, apresentavam suas fibras fragmentadas, intumescidas e algumas v^êzes formando grumos, havendo também um certo grau de dissociação entre elas. As medidas de birrefringência dos feixes dos tendões injetados foi realizada nos feixes que apresentavam estas alterações acima descritas.

O aspecto fotomicrográfico pode ser visto nas fotomicrografias das FIGS. 11 e 12.

5.2.1 - QUADRO 1 - MEDIDAS DE RETARDO ÓPTICO DE TENDÃO
NORMAL

45,450
 46,965
 45,450
 50,904
 45,450
 45,450
 40,905
 49,086
 45,450
 49,389
 50,298
 43,935
 43,935
 43,026
 45,450
 43,026
 41,511
 42,727
 46,662
 46,965
 42,420
 46,965

$$\sum X = 1000,419$$

$$\sum X^2 = 45.742,983$$

$$\frac{(\sum X)^2}{22} = 45.583,636$$

$$s^2 = 7,588$$

$$s = 0,345$$

$$\bar{X} = 45,519$$

QUADRO 2

QUADRO DAS MEDIDAS DOS TENDÕES INJETADOS

| 30 minutos | 60 minutos | 60 minutos | 90 minutos |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 16,362 | 29,088 | 30,300 | 21,210 |
| 16,968 | 24,240 | 28,482 | 16,695 |
| 18,180 | 26,361 | 27,270 | 22,725 |
| 15,150 | 23,634 | 28,785 | 22,725 |
| 13,029 | 23,634 | 28,189 | 17,271 |
| 16,665 | 23,937 | 30,300 | 24,240 |
| 21,513 | 23,937 | 30,300 | 25,755 |
| 22,119 | 22,725 | 22,422 | 21,816 |
| 22,725 | 22,725 | 23,634 | 22,422 |
| 22,119 | 24,846 | 24,240 | 21,816 |
| 18,786 | 26,664 | 21,210 | 25,755 |
| 20,907 | 17,877 | 25,149 | 22,119 |
| 21,816 | 21,210 | 21,119 | 27,270 |
| 21,210 | 19,695 | 23,634 | 26,361 |
| 20,604 | 19,695 | 21,210 | 20,301 |
| 16,665 | 21,816 | 24,846 | 22,422 |
| 18,483 | 30,300 | 21,210 | 23,028 |
| 21,210 | 24,240 | | 16,059 |
| | <u>21,210</u> | | |
| $\bar{X} = 19,139$ | $\bar{X} = 23,570$ | $\bar{X} = 23,985$ | $\bar{X} = 22,380$ |

QUADRO DAS MEDIDAS DOS TENDÕES INJETADOS (cont.)

| 120 minutos | 120 minutos | 180 minutos | 180 minutos |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 26,058 | 24,846 | 30,300 | 31,815 |
| 21,816 | 29,088 | 36,360 | 30,300 |
| 27,270 | 27,270 | 24,240 | 31,209 |
| 22,119 | 30,300 | 21,210 | 28,785 |
| 27,270 | 29,088 | 27,270 | 30,300 |
| 25,755 | 25,755 | 24,240 | 29,088 |
| 20,301 | 28,482 | 25,755 | 25,755 |
| 18,786 | 25,755 | 21,210 | 35,451 |
| 15,150 | 27,270 | 24,240 | 30,906 |
| 22,725 | 25,452 | 16,059 | 28,785 |
| 22,119 | 26,361 | 17,877 | 33,936 |
| 23,634 | 27,270 | 19,089 | 27,270 |
| 24,846 | 27,270 | 18,483 | 27,270 |
| 20,907 | 24,240 | 17,271 | 32,421 |
| 16,362 | 26,058 | 15,756 | 30,603 |
| 27,876 | 30,300 | 16,665 | 25,149 |
| 27,876 | 29,088 | | 25,755 |
| 23,634 | | | 27,270 |
| $\bar{X}=23,028$ | $\bar{X}=27,288$ | $\bar{X}=22,252$ | $\bar{X}=29,559$ |

5.2.2 - QUADRO DOS HISTOGRAMAS

Nas figuras 14 e 15 são apresentados os histogramas elaborados com os dados dos quadros 1 e 2. A finalidade é mostrar as relações entre o padrão normal e os resultados obtidos através das medidas efetuadas sobre os feixes de tendões tratados.

5.2.3 - RESULTADOS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O problema fundamental é verificar se as áreas obtidas através das medidas dos tendões tratados são diferentes do padrão normal. Ou ainda, se os resultados das medidas dos tendões tratados são diferentes, como um todo, do padrão normal, tendão normal.

Para a comparação das médias era testada a homogeneidade das variâncias. Como as amostras tinham diferentes tamanhos, a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Bartlett.

O teste deu o seguinte resultado:-

$$B = 24,443$$

$$X_{\phi}^2 = g = 16,920$$

que permite concluir que as variâncias diferem, isto é, não são homogêneas. (Para que as variâncias fossem consideradas homogêneas, B deveria ser menor que $X_{\phi}^2 = g$). Há uma heterocedasticidade que não pode ser resolvida pela aplicação de logaritmos.

A alternativa seguinte era agrupar todos os dados dos tendões tratados em uma única população e compará-las com o padrão normal.

Para comparar o padrão normal contra os tendões tratados como um todo, era feita a comparação de variâncias, tes

te F.

$$F_c = \frac{s^2 - \text{trat.}}{s^2 - \text{norm.}} = 27,8531/7,5879 = 3,670$$

$F_c = 3,670$ contra o $F_{5\%} = 1,810$ tabulado, permite rejeitar a hipótese de igualdade das variâncias. Não se podia aplicar o teste "t" diretamente e nem fazer-se a análise das variâncias.

Contudo nestas condições podia-se usar uma aproximação. Aplicava-se neste caso o teste de Hald que permite uma boa aproximação.

Neste caso:-

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2 - S}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_1}}}$$

(1) foi estudada por B.L. Welch, e os limites unilaterais de significância de 1% e 5% como funções de t_1 e t_2 , e

$$C = \frac{\frac{s^2}{n_1}}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_1}}$$

(2) fórmula especial, cujos valores foram tabulados por A.A. Aspin (Tables for use in comparisons whose accuracy involve two variances, separately estimated, Biometrika: 36:299,1949).

Na mesma revista Welch mostrou que uma aproximação a êsses limites poderia ser obtida da distribuição "t", já que as variáveis em (1) são distribuídas aproximadamente com um t de f graus, onde:-

$$\frac{1}{f} = \frac{C^2}{f_1} + \frac{(1-C)^2}{f_2}$$

isto é, f está entre o menor dos dois números f_1 e f_2 e a soma t_1 e t_2 . Além disso, se f_1 fôr maior que 30 e f_2 fôr maior que 30, pode ser considerado uma boa aproximação.

Ora, comparando as médias dos tendões tratados com as do tendão normal, encontrava-se:-

$$t_c = 28,049$$

$$t_{5\%} = 1,98$$

Rejeitamos, pois, a igualdade das médias.

As médias diferem significativamente. Isto é, o tratamento pela histamina provoca uma diminuição da birrefringência em determinadas áreas dos tendões tratados.

Contudo, a observação dos histogramas e dos dados sugeria duas possibilidades. Primeiro, que os dois grupos de medidas com 60 minutos podiam ser agrupados em um só grupo, tanto quanto os dois grupos com 120 minutos. Segundo, que os dois grupos de medidas em 180 minutos não entrassem no tratamento estatístico, pois que eram os grupos com maior variação

Assim procedia-se a análise estatística.

*

QUADRO 3

MEDIDAS DE RETARDO ÓPTICO DE TENDÃO NORMAL (EM MILIMICRONS)

Tendões injetados a

| TESTEMUNHA | 30 minutos | 60 minutos | 60 minutos |
|----------------|---------------|---------------|------------|
| 45,450 | 16,362 | 29,088 | 30,300 |
| 46,965 | 16,968 | 24,240 | 28,482 |
| 45,450 | 18,180 | 26,361 | 27,270 |
| 50,904 | 15,150 | 23,634 | 28,785 |
| 45,450 | 13,029 | 23,634 | 28,179 |
| 45,450 | 16,665 | 23,937 | 30,300 |
| 40,905 | 21,513 | 23,937 | 30,300 |
| 49,086 | 22,119 | 22,725 | 22,422 |
| 45,450 | 22,725 | 22,725 | 23,634 |
| 49,389 | 22,119 | 24,846 | 24,240 |
| 50,298 | 18,786 | 26,664 | 21,210 |
| 43,935 | 20,907 | 17,877 | 25,149 |
| 43,935 | 21,816 | 21,210 | 21,119 |
| 43,026 | 21,210 | 19,695 | 23,634 |
| 45,450 | 20,604 | 19,665 | 21,210 |
| 43,026 | 16,665 | 21,816 | 24,846 |
| 41,511 | 18,483 | 30,300 | 21,210 |
| 42,727 | 21,210 | 24,240 | |
| 46,662 | | 21,210 | |
| 46,965 | | | |
| 42,420 | | | |
| 46,965 | | | |
| <hr/> 1001,419 | <hr/> 344,511 | <hr/> 880,124 | |

| 90 minutos | 120 minutos | 120 minutos |
|---------------|---------------|-------------|
| 21,210 | 26,058 | 24,846 |
| 19,695 | 21,816 | 29,088 |
| 22,725 | 27,270 | 27,270 |
| 22,725 | 22,119 | 30,300 |
| 17,271 | 27,270 | 29,088 |
| 24,240 | 25,755 | 25,755 |
| 25,755 | 20,301 | 28,482 |
| 21,816 | 18,786 | 25,755 |
| 22,422 | 15,150 | 27,270 |
| 21,816 | 22,725 | 25,452 |
| 25,755 | 22,119 | 26,361 |
| 22,119 | 23,634 | 27,270 |
| 27,270 | 24,846 | 27,270 |
| 26,361 | 20,907 | 24,240 |
| 20,301 | 16,362 | 26,058 |
| 22,422 | 27,876 | 30,300 |
| 23,028 | 27,876 | 29,088 |
| 16,059 | 23,634 | |
| <hr/> 402,990 | <hr/> 888,093 | |

Análise preliminar:

| | G.L. | S.Q. | Q.M. | F |
|-------------|------|-------------|-----------|----------|
| Tratamentos | 4 | 9,396,58838 | 2,349,147 | 224,7*** |
| Resíduos | 124 | 1.296,25316 | 10,453 | |

Numa segunda análise, procuramos testar testemunha versus tratados, encontramos:

| | G.L. | S.Q. | Q.M. | F |
|-----------------------------|------|-------------|------------|----------|
| Testemunha x tratados | 1 | 8.911,14796 | 8.911,1480 | 825,5*** |
| Entre tratados. | 3 | 485,44056 | 161,813 | 15,5*** |
| Resíduos | 124 | | 10,453 | |

Conclui-se que a testemunha difere significativamente dos injetados ao nível superior a 0,1% de probabilidade.

Foi feito teste de Tukey de comparação da média testemunha (45,52) com as médias dos tratados e verificou-se ser esta média diferente significativamente das demais.

Verificou-se, pelo mesmo teste, não serem significativas as médias entre tratados (pelo teste de Tukey.)

Numa posterior análise, de variância, em que se procurou verificar a tendência à regressão linear, obteve-se o seguinte resultado:

| | G.L. | Q.M. | F |
|----------------------------|------|------------|-----------|
| Testemunha x tratados | 1 | 8.911,1480 | 852,5 *** |
| Regressão linear | 1 | 237,4126 | 22,71 *** |
| Desvio da Regressão | 2 | 124,0140 | 11,86 *** |
| Resíduo | 124 | 10,453 | |

Foi altamente significativo, ao nível de 0,1% de probabilidade, a regressão linear. É aceitável a hipótese das

das médias crescerem linearmente tendendo à normalidade. O fato de ser significativo também o desvio de regressão, isto indica que regressões de 2º e 3º graus poderiam ser isoladas da análise, porém sem interesse para o estudo em questão:

5.3 - RESULTADOS DAS MEDIDAS POR INTERFERÊNCIA

As imagens dos feixes por interferometria podem ser vistas nas FIGURAS 16 e 17.

Êstes resultados serão apresentados obedecendo a seguinte ordem:

5.3.1 - Resultados imediatos das leituras dos retardos ópticos e seu tratamento estatístico.

5.3.2 - Índices de refração e seu tratamento estatístico.

5.3.3 - Massas sêcas e seu tratamento estatístico.

Os índices de refração e a massa sêca são calculados à partir dos retardos ópticos.

Tenha-se em mente que o retardo óptico por métodos interferométricos não é o mesmo fenômeno, retardo óptico, lido nas mensurações de birrefringência. Neste caso, mede-se a diferença de fase que nasce pela interação das moléculas do meio birrefringente com a frente de onda polarizada que o atravessa: na interferometria mede-se a diferença de fase entre a onda que atravessa o objeto e a onda que atravessa o meio que o embebe. Evidentemente êste retardo óptico é proporcional aos índices de refração, do meio de embebição e o do objeto.

Quando o objeto a ser medido por interferometria é birrefringente exige-se que sejam feitas duas medidas, uma vez que o objeto birrefringente possui dois índices de refra

ção.

5.3.1 - RETARDOS ÓPTICOS (RO)

TENDÕES NORMAIS

| Direção alfa Transversal à fibra | Direção gama Paralela à fibra |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 195,738 | 220,886 |
| 169,680 | 170,892 |
| 193,010 | 213,312 |
| 188,769 | 228,765 |
| 176,043 | 192,708 |
| 192,708 | 203,313 |
| 190,284 | 235,431 |
| 172,407 | 211,494 |
| 166,650 | 186,345 |
| 174,830 | 191,799 |
| 151,500 | 183,921 |
| 152,712 | 219,978 |
| 152,409 | 203,010 |
| 163,923 | 202,404 |
| 169,983 | 185,981 |
| 164,135 | 188,163 |
| 148,470 | 206,646 |
| 156,630 | 189,981 |
| 187,554 | 218,160 |
| 151,500 | 199,374 |
| 182,224 | 224,220 |
| $\bar{X} = 171,484$ | $\bar{X} = 203,656$ |

TENDÕES TRATADOS

| RO Direção alfa Transversal à fibra | RO Direção gama Paralela à fibra |
|--|-------------------------------------|
| 251,490 | 356,631 |
| 204,525 | 235,734 |
| 198,768 | 214,827 |
| 244,521 | 263,004 |
| 188,466 | 224,523 |
| 217,251 | 148,773 |
| 186,951 | 196,950 |
| 208,858 | 240,582 |
| 203,919 | 215,130 |
| 189,072 | 234,219 |
| 209,676 | 233,916 |
| 242,400 | 276,942 |
| 235,734 | 227,553 |
| 203,616 | 281,790 |
| 218,766 | 269,670 |
| <hr/> | <hr/> |
| X = 216,1583 | X = 242,1159 |

RESULTADO ESTATÍSTICO COMPARANDO AS DIREÇÕES ALFA

Para o tendão normal tem-se os seguintes dados:

$$\text{Média: } \bar{X} = 171,484$$

$$\sum x^2 = 622.506,312883$$

$$\sum x = 3.601,159$$

$$\frac{(\sum x)^2}{n} = \frac{12.968.346,143291}{21} = 617.540,925372$$

$$s^2_1 = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n-1} = 248,27$$

$$s^2_1 = 248,27$$

Para o tendão injetado, na direção alfa, tem-se:

$$\text{Média: } \bar{X} = 216,158$$

$$\sum x^2 = 755.388,655801$$

$$\sum x = 3.458,533$$

$$\frac{(\sum x)^2}{n} = \frac{11.961.450,512089}{16} = 747.590,657006$$

$$s^2_3 = 519,87$$

Comparação das variâncias - Teste F.

$$\frac{s^2_3}{s^2_1} = \frac{519,87}{248,27} = 2,09$$

Ora, $F_{5\%} = 2,33$ o que permite admitir-se a igualdade das variâncias.

Realizava-se então o Teste t:

$$t = \frac{216,158 - 171,484}{\sqrt{\frac{519,87}{16} + \frac{248,27}{21}}}$$

Donde tira-se o valor de $t = 6,72$. Desde que os valores tabulados para t , com 35 graus de liberdade são respectivamente:

$t_{5\%} = 2,03$ e $t_{1\%} = 2,72$ pode-se concluir que as médias tem 99% de probabilidade de serem diferentes.

O tendão injetado com histamina apresenta feixes com um retardo óptico maior no sentido da direção alfa, perpendicular ao longo eixo do feixe, de propagação da luz do raio de mensuração.

RESULTADO ESTATÍSTICO COMPARANDO AS DIREÇÕES GAMA

Tendão Normal.

$$\text{Média: } \bar{X} = 203,656$$

$$\sum x^2 = 876,777,144209$$

$$\sum x = 4.276,783$$

$$\frac{(\sum x)^2}{n} = \frac{18.290.872,829089}{21} = 870.993,944242$$

$$s^2_2 = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n - 1} = \frac{5.783,199967}{20} = 289,16$$

$$s^2_2 = 289,16$$

Tendão injetado

$$\text{Média: } X = 242,116$$

$$\sum x^2 = 962.070,360555$$

$$\sum x = 3.873,855$$

$$\frac{(\sum x)^2}{n} = \frac{15.006.752,56025}{16} = 937,922,035064$$

$$s_4^2 = \frac{40.148,305491}{15} = 267,66$$

$$s_4^2 = 267,66$$

Comparando as varianças, teste F, tem-se:-

$$\frac{s_2^2}{s_4^2} = \frac{289,16}{267,66} = 1,08$$

Ora êste valor para o F encontrado é bem menor que F tabulado, $F_{5\%} = 2,33$.

Tal resultado permite a comparação das médias pelo teste t.

Usando a mesma fórmula já anteriormente empregada para encontrar t, acharemos:-

$$\frac{242,116 - 203,656}{\sqrt{\frac{267,66}{16} + \frac{289,16}{21}}} = 6,97$$

Como já foram encontrados anteriormente, os valores tabulados para t com 35 graus de liberdade, são: $t_{5\%} = 2,03$ e $t_{1\%} = 2,72$ que são bem menores que o t encontrado, pode-se afirmar então que, com 99% de probabilidade, o tendão injetado apresentou uma média diferente do normal.

**

5.3.2 - QUADRO DOS ÍNDICES DE REFRAÇÃO

| TENDÃO NORMAL | | TENDÃO INJETADO 1 hora após injetado | |
|--------------------|--------------------|---|--------------------|
| Direção alfa | Direção Gama | Direção Alfa | Direção Gama |
| 1,5106 | 1,5142 | 1,5186 | 1,5336 |
| 1,5069 | 1,5071 | 1,5119 | 1,5163 |
| 1,5102 | 1,5131 | 1,5110 | 1,5163 |
| 1,5096 | 1,5153 | 1,5176 | 1,5202 |
| 1,5078 | 1,5120 | 1,5096 | 1,5147 |
| 1,5102 | 1,5117 | 1,5137 | 1,5041 |
| 1,4970 | 1,5163 | 1,5094 | 1,5108 |
| 1,5073 | 1,5129 | 1,5125 | 1,5178 |
| 1,5065 | 1,5093 | 1,5118 | 1,5134 |
| 1,5076 | 1,5100 | 1,5097 | 1,5161 |
| 1,5043 | 1,5089 | 1,5126 | 1,5161 |
| 1,5045 | 1,5141 | 1,5181 | 1,5222 |
| 1,5044 | 1,5117 | 1,5163 | 1,5189 |
| 1,5061 | 1,5116 | 1,5117 | 1,5152 |
| 1,5069 | 1,5092 | 1,5139 | 1,5229 |
| 1,5061 | 1,5095 | 1,5190 | 1,5212 |
| 1,5039 | 1,5122 | | |
| 1,5050 | 1,5098 | | |
| 1,5094 | 1,5138 | | |
| 1,5043 | 1,5111 | | |
| 1,5087 | 1,5147 | | |
| $\bar{X} = 1,5065$ | $\bar{X} = 1,5117$ | $\bar{X} = 1,5135$ | $\bar{X} = 1,5174$ |

Atualmente fizemos medidas interferométricas para determinação de índices de refração e massas secas de feixes de colágeno - sem fixação e sem passar por qualquer processo que possa extrair material solúvel do feixe, encontramos os seguintes resultados:

índice de refração na direção alfa: $\bar{n} = 1,5376$, $s = 0,0070$

índice de refração na direção beta: $\bar{n} = 1,5434$, $s = 0,0145$

Massas secas:

na direção alfa: $20,342 \cdot 10^{-12}$ g.

na direção gama: $21,088 \cdot 10^{-12}$ g.

O autor a par de estudar a quantidade de corante que se fixa na fibra discute, neste trabalho, a presença de material solúvel no feixe de colágeno e cuja extração promove a queda dos índices de refração e massas secas dos feixes incluídos e cortados em blocos de parafina.

Recomenda também cautela na escolha da metodologia em função das variações que se pretende estudar.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO:- DIREÇÃO ALFA - TENDÃO TRA
TADO CONTRA TENDÃO NORMAL

Para efetuar o tratamento estatístico eliminou-se a vírgula e subtraiu-se 10.000 unidades de tôdas as cifras.

Tendão Normal

$$\begin{aligned}
 n_1 &= 21 \\
 \bar{X} &= 5065 \\
 \sum x_1 &= 106.373 \\
 \sum x_1^2 &= 538.838.623 \\
 (\sum x_1)^2 &= 11.315.215.129 \\
 \frac{(\sum x_1)^2}{21} &= 538.819,768 \\
 s_1^2 &= \frac{538.838.623 - 538.819,768}{20} = \frac{18.855}{20} = 942,75 \\
 s_1^2 &= 942,75
 \end{aligned}$$

Tendão Injetado - 60 minutos

$$\begin{aligned}
 n_3 &= 16 \\
 \bar{X}_3 &= 5135 \\
 \sum x_3 &= 82.174 & (\sum x_3)^2 &= 6.752.566.276 \\
 \sum x_3^2 &= 422.051.928 & \frac{(\sum x_3)^2}{n_3} &= 422.035.392 \\
 s_3^2 &= \frac{422.051.928 - 422.035.392}{20} = 1.102,4 \\
 s_3^2 &= 1.102,4
 \end{aligned}$$

teste F:

$$F_c = s_3^2 / s_3^2 = \frac{1.102,4}{942,7} = 1,17$$

$$F_c = 1,17$$

Ora, como $F_{5\%}$ tabulado é igual à 2,33, podia-se concluir que pela igualdade das variâncias e aplicar o teste t, o que era feito, e descreve-se em seguida:

$$t = \frac{5135 - 5065}{\sqrt{\frac{1.102,4}{16} - \frac{942,75}{21}}} = 7$$

Tendo-se para o t encontrado o valor 7 e para ... $t_{5\%}$ 2,03, para $t_{1\%}$ 2,72, podemos dizer que as médias têm 99% de possibilidade de serem diferentes.

O tendão injetado tem índice de refração, na direção alfa, diferente e maior que o tendão normal, nas partes alteradas dos feixes.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO - Direção Gama - Tendão tratado contra tendão normal

Procedendo da mesma forma e simplificando os dados, obtinha-se os seguintes resultados, sumariamente:-

Comparação das variâncias:

$$F_c = s_4^2 / s_2^2 = 6,709$$

$$F_{5\%} = 2,3$$

Portanto, as variâncias diferem significativamente. Não é possível a aplicação do teste t.

Resta a alternativa de aplicar-se o teste t aproximado: $t_c = 0,024$ $t_{5\%} = 2,120$

Aceita-se a igualdade das médias.

As médias não diferem.

5.3.3 - QUADRO DAS MASSAS SÊCAS.

| TENDÃO NORMAL | | TENDÃO INJETADO 1 hora após aplicação | |
|----------------------------|----------------------------|--|------------------------------|
| Direção Alfa | Direção Gama | Direção Alfa | Direção Gama |
| 13,8182.10 ⁻⁸ | 14,0767.10 ⁻⁸ | 14,4376.10 ⁻⁸ | 15,6059.10 ⁻⁸ |
| 13,5286.10 ⁻⁸ | 13,5421.10 ⁻⁸ | 13,9158.10 ⁻⁸ | 14,2626.10 ⁻⁸ |
| 13,7878.10 ⁻⁸ | 14,0134.10 ⁻⁸ | 13,8518.10 ⁻⁸ | 14,0303.10 ⁻⁸ |
| 13,7440.10 ⁻⁸ | 14,2851.10 ⁻⁸ | 14,3602.10 ⁻⁸ | 14,5656.10 ⁻⁸ |
| 13,5993.10 ⁻⁸ | 13,7845.10 ⁻⁸ | 13,7374.10 ⁻⁸ | 14,1380.10 ⁻⁸ |
| 13,7845.10 ⁻⁸ | 13,9023.10 ⁻⁸ | 14,0572.10 ⁻⁸ | 13,2963.10 ⁻⁸ |
| 13,7576.10 ⁻⁸ | 13,2592.10 ⁻⁸ | 13,7205.10 ⁻⁸ | 13,8316.10 ⁻⁸ |
| 13,5589.10 ⁻⁸ | 13,9932.10 ⁻⁸ | 13,9160.10 ⁻⁸ | 14,3164.10 ⁻⁸ |
| 13,4950.10 ⁻⁸ | 13,1582.10 ⁻⁸ | 13,9091.10 ⁻⁸ | 14,0336.10 ⁻⁸ |
| 13,5858.10 ⁻⁸ | 13,7744.10 ⁻⁸ | 13,7441.10 ⁻⁸ | 14,2457.10 ⁻⁸ |
| 13,3266.10 ⁻⁸ | 13,1313.10 ⁻⁸ | 13,9730.10 ⁻⁸ | 14,2424.10 ⁻⁸ |
| 13,3401.10 ⁻⁸ | 14,0875.10 ⁻⁸ | 14,3366.10 ⁻⁸ | 14,7204.10 ⁻⁸ |
| 13,3367.10 ⁻⁸ | 14,1990.10 ⁻⁸ | 14,2626.10 ⁻⁸ | 14,4612.10 ⁻⁸ |
| 13,4646.10 ⁻⁸ | 13,8922.10 ⁻⁸ | 13,9057.10 ⁻⁸ | 14,3134.10 ⁻⁸ |
| 13,5320.10 ⁻⁸ | 13,7094.10 ⁻⁸ | 14,0740.10 ⁻⁸ | 14,7743.10 ⁻⁸ |
| 13,4670.10 ⁻⁸ | 13,7440.10 ⁻⁸ | 14,4713.10 ⁻⁸ | 14,6396.10 ⁻⁸ |
| 13,2930.10 ⁻⁸ | 13,9394.10 ⁻⁸ | | |
| 13,3836.10 ⁻⁸ | 13,7542.10 ⁻⁸ | | |
| 13,8383.10 ⁻⁸ | 14,0673.10 ⁻⁸ | | |
| 13,3266.10 ⁻⁸ | 13,8586.10 ⁻⁸ | | |
| 13,6680.10 ⁻⁸ | 14,1346.10 ⁻⁸ | | |
| $\bar{X}=13,5541.10^{-8}g$ | $\bar{X}=13,8712.10^{-8}g$ | $\bar{X}_1=14,0504.10^{-8}g$ | $\bar{X}_2=14,3423.10^{-8}g$ |

TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS SÔBRE MASSA SÊCA

Tendão Normal contra Tendão Injetado - depois de 60 minutos.

Direção Alfa

Dar-se-ão os resultados de forma resumida.

Comparação das variâncias: Teste F.

$$F_c = s_3^2 / s_1^2 = 37,293$$

Como o $F_{5\%}$ tabulado tem o valor de 2,3, rejeitava-se a hipótese de igualdade das variâncias e conseqüentemente, fica afastada a possibilidade de uso do teste t.

A comparação, nestas condições, era feita pelo teste t aproximado, Hald.

Tem-se:

$$t_c = 14,41$$

$$t_{5\%} = 2,120$$

Rejeitava-se a hipótese de igualdade das médias.

A massa sêca do tendão tratado pela histamina é maior no sentido transversal à fibra. Isto é, na direção alfa.

Tendão Normal contra tendão injetado na Direção Gama

Seguindo-se a mesma orientação tem-se:

Teste F.

$$F_c = s_4^2 / s_2^2 = 2,583$$

$$F_c = 2,583$$

$$F_{5\%} = 2,3$$

Novamente diante da diferença das variâncias não se podia realizar o teste t direto.

Contudo é possível comparar as médias pelo teste t aproximado.

$$t_c = 10,699$$

$$t_{5\%} = 2,080$$

Fundamentando-se na diferença dos t, é possível rejeitar a hipótese de igualdade das médias.

A média das massas secas na direção gama dos tendões injetados é diferente, maior, que a dos tendões normais.

**
*
*

6 - DISCUSSÃO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

Constatava-se, após a injeção de histamina, uma separação dos componentes dos feixes de colágeno.

(Leia-se o seguinte parágrafo entre o primeiro e o segundo)

As transformações experimentadas pelos feixes do colágeno são devidas à histamina uma vez que o antihistamínico - impede o aparecimento das transformações detectadas.

Assim as modificações notadas nos feixes de colágeno e discutidas á seguir, devem ser imputadas à histamina.

bras espessadas e apresentando alterações tintoriais, na periferia das vesículas provocadas por histamina. O autor não explica o mecanismo destas modificações, como não as relaciona seja com o aumento da permeabilidade vascular, seja com um papel, uma função, mais ampla da droga dentro de uma fisiologia do tecido conjuntivo.

As alterações supra citadas só podem ser compreendidas em função das informações histoquímicas e histofísicas.

Higginbotham (1959) e outros, apresentam dados positivos e discutem as transformações fibroblásticas sob a influência da desgranulação mastocitária.

Das observações destes autores, fica patente que os fibroblastos fagocitam e metabolizam os grânulos dos mastó-

cidos. O mesmo autor afirma que entre 24 e 48 horas, todos êsses produtos, grânulos de mucopolissacarídeos, são metabolizados pelos fibroblastos.

Das discussões em tórno dos mastócitos e suas substâncias, encontradas nesta bibliografia, consta um tópico sobre a ação de antígenos sobre os fibroblastos (pag. 173), que se apresentavam contraídos e intensamente corados, e Meyer (1959) diz: "I wonder whether this effect on the fibroblast is a direct action of the antiserum on the cells or whether it is secondary to a release of histamine or serotonin released by some cells in the vicinity of the fibroblasts".

Ora, a reação antígeno-anticorpo comprovadamente libera histamina; quando o mastócito desgranula-se há a saída de histamina. Mota, citado por Higginbotham (1959) e por Rocha e Silva (1964) mostrou que o antígeno provoca a liberação de grânulos e histamina dos mastócitos.

Quando se confrontam os resultados histoquímicos desta pesquisa com os comentários acima, se é levado a concordar com Meyer, acima referido; isto é, a histamina é que induz as modificações fibroblásticas.

Êstes fatos levaram Riley (1962) a responsabilizar a histamina por uma preparação das células do tecido conjuntivo para receber a heparina que será então metabolizada. Explica êste autor, desta maneira, a presença de ambas no mastócito: "... esta seria libertada após a ação rápida e preparadora daquela".

Os resultados desta pesquisa mostram que a histamina, só, é suficiente para promover as modificações celulares como também provocar uma maior metacromasia em determinadas áreas e, no citoplasma de fibroblastos.

Êstes resultados são também sugestivos de que há

modificações metabólicas dos mucopolissacarídeos ácidos.

As colorações realizadas pela corifosfina confirmam os comentários acima realizados.

Vizioli-Vidal (1966), estudando a fluorescência dos cortes tratados pela corifosfina, em diferentes potenciais hidrogeniônicos, com técnicas de bloqueio, metilação, metilação - saponificação, empregando também digestão pela hialuronidase testicular, concluíram que a coloração pela solução de corifosfina a 1/10.000 produz uma fluorescência vermelha quando reagem com os mucopolissacarídeos.

As soluções tamponadas com pH 4 coram os mucopolissacarídeos ácidos carbonílicos e sulfatados, mas, com pH 2,5, só coram os mucopolissacarídeos sulfatados.

Dada a importância dos mucopolissacarídeos na homeostasia do tecido conjuntivo em geral e dos feixes de colágeno em particular, deixam-se para posterior as considerações de ordem macromolecular estrutural, oportunidade na qual comentar-se-ão os resultados histofísicos.

ALTERAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA NATURAL

O colágeno é naturalmente fluorescente - Bachman e Ellis (1965), Banga (1965), Fujimori (1966)*, La Bella e Paul (1965), La Bella (1966).

Segundo Bachman e Ellis (1965), a fluorescência dos ossos é devida a combinação do colágeno e da apatite; o colágeno aumentaria a fluorescência total, no osso. La Bella e Paul (1965) relacionando a fluorescência do tendão humano com o conteúdo em tirosina e a idade, constatam um aumento de fluo

* = Esta tese já estava em redação quando os trabalhos de 1966 foram publicados.

rescência, uma diminuição do conteúdo em tirosina e da solubili-
dade do colágeno, os autores concluem que os resíduos de tirosi-
na, na cadeia proteica, sofrem oxidação, com o aparecimento de
estruturas quinóides reativas e com capacidade de formar grupos
ligados por covalência. Sendo assim, é possível que os grupos ti-
rosínicos terminais representem, em potencial, lugares de liga-
ção cruzada.

La Bella (1966), referindo-se aos seus trabalhos an-
teriores e pesquisando a ação das irradiações U.V. sôbre elasti-
na e colágeno, conclui que o material fluorescente aumenta com
uma diminuição da tirosina. Fujimori (1966), estudando a ação
da irradiação U.V. sôbre o colágeno, acha que as moléculas pas-
sam por uma fotopolimerização, parecendo ao autor que a tirosi-
na e a fenil-alanina estão envolvidos nesta reação fotoquímica.
Partridge (1963), estudando a elastina encontrou um pigmento a-
marelo fluorescente. A fluorescência nestes casos é devida a um
grupo cromóforo que teria um papel na formação entre as ligações
pônticas entre as cadeias peptídicas. Contudo, Banga, (1965) diz
que a elastina contém vários tipos de substâncias fluorescentes.
Mas, como já foi citado, La Bella (1966), na elastina também há
uma transformação da tirosina. Como se pode depreender dêsses co-
mentários, a fluorescência natural pode ser aceita como devida a
grupos cromóforos aromáticos implicados na ligação das cadeias
proteicas do colágeno. Como consequência da aplicação da histami-
na, haviam modificações nos feixes de colágeno, com um aumento
da fluorescência natural.

O aumento da fluorescência poderia ser devido a um
aumento concomitante dos grupos cromóforos, hipótese que nas con-
dições da presente pesquisa não deveria ser aceita. Prefere-se
aceitar a idéia de que nos locais da fragmentação, intumescimen-
to e formação de grumos dos feixes, há na realidade um aumento
de material fluorescente nestes locais, o que é confirmado pelas

medidas por interferometria, como discutir-se-á adiante.

DICROÍSMO

A aplicação prática do estudo do dicroísmo em feixes de colágeno corados pelo azul de toluidina tamponado para pH 4 foi amplamente discutido por Vidal (1963). O dicroísmo nestas condições, significa uma orientação macromolecular dos mucopolissacarídeos ácidos e estes resultados foram confirmados por Romhanyi (1963) e Missmahl (1964).

Vidal (1964), estudando a birrefringência de forma dos feixes de colágeno, determinou que a extração enzimática dos mucopolissacarídeos ácidos provocava uma diminuição da birrefringência de forma do feixe. Resultados que, confirmando os das pesquisas com dicroísmo, permite aceitar para as cadeias dos polissacarídeos em questão, um arranjo paralelo às cadeias de proteína de colágeno não inclinadas como pensa Matheus (1965)

Quanto à diminuição ou perda do dicroísmo, Vidal (1964) pode mostrar, em tendões desinseridos em uma extremidade, que formavam-se zonas de intumescimento, fragmentação e formação de grumos nos feixes de colágeno. Nestas áreas desaparecia o dicroísmo, embora permanecessem parcialmente a birrefringência. Discutindo o fenômeno, o autor conclui que nestas zonas há uma gradual desorientação das macromoléculas de mucopolissacarídeos ácidos.

Ora, pela injeção de histamina nas adjacências dos feixes do tendão, observam-se modificações semelhantes e já descritas.

A perda de dicroísmo significa perda de orientação macromolecular, sua diminuição, perda parcial ou gradual da orientação das macromoléculas. Ora, a histamina além de provocar modificações morfológicas e histoquímicas, traz, concomitante-

mente com sua presença, nestas condições experimentais, alteração na orientação macromolecular dos mucopolissacarídeos ácidos.

Lembrando mais uma vez que as modificações de di-croísmo acompanham as morfológicas e histoquímicas, se é levado a crer em modificações metabólicas do tecido conjuntivo que redundam em uma transformação da sua homeostasia.

Esta idéia é corroborada também por casos de doenças do tecido conjuntivo e dados experimentais, Vidal (1964). Recentemente, estudos levados a efeito com microscopia de polarização, em material de osteogênese imperfecta, Vizsloy e Kasza (1965) mostraram que há um aumento da quantidade de polissacarídeos da substância fundamental, o que resultaria na formação de fibras com estrutura sub-microscópica anormal. Estas fibras desintegram-se espontaneamente sob certas influências endógenas e exógenas.

Banga e Baló (1965), estudando as correlações entre as ligações cruzadas, a estrutura estética e a digestibilidade do colágeno afirmam: "Probably the ordered structure of the matrix material keeping the fibers together is abolished where by the proteolytic enzymes get touch with peptide bands!"

O que está de acôrdo com Vidal (1964) e com os resultados da presente tese, isto é, há uma desorientação dos mucopolissacarídeos ácidos antes do desaparecimento total da birrefringência; os mucopolissacarídeos perdem suas relações biofísicas com o colágeno, sendo êste então mais facilmente destruído.

BIRREFRINGÊNCIA - INTERFEROMETRIA

Vidal e Bozzo (1966) em um estudo estatístico sô-

bre a variação da birrefringência dos feixes de colágeno dão ênfase à grande importância do método para os estudos sub-microscópicos dos feixes de colágeno. Neste trabalho os autores concluem que, estatisticamente, não existe uma variação significativa entre as medidas obtidas de cortes de um mesmo tendão e as medidas obtidas de dez tendões diferentes. A birrefringência calculada com os retardos ópticos de diferentes tendões era de 0,0067, a birrefringência calculada com os dados da presente tese é de 0,0065.

Após o tratamento pela histamina se pode constatar uma diminuição da birrefringência de cerca de 38%. O tratamento estatístico comprova esta afirmação. A observação dos histogramas sugere que com o decorrer do tempo, havia um aumento das médias dos tendões tratados; esta hipótese encontra um bom suporte na análise de regressão linear. Pode-se, então, aceitar a idéia de que os feixes de colágeno apresentam uma tendência à recuperação após a ação da histamina.

A diminuição da birrefringência provocada pela histamina também é comprovada pelas determinações interferométricas.

O tratamento estatístico revela que a histamina provoca alterações significativas nos índices de refração, aumentando-os, principalmente nos da direção "Alpha". O aumento dos índices de refração é acompanhado por uma redução da sua diferença, isto é, da birrefringência em cerca de 30%, o que era de esperar, uma vez que o tratamento estatístico promove diferenças significativas nos seus valores.

Êstes fatos tornam-se mais claros quando se observam os valores e o significado das massas secas.

Constata-se que há um aumento de massa, para a mesma área; o maior aumento de massa foi na direção "alpha", transversal do feixe de colágeno.

Êstes dados permitem deduzir que se operam modificações estruturais importantes nas moléculas do feixe.

Em primeiro lugar a diminuição da birrefringência significa uma perda da estrutura cristalina, passando certa quantidade para uma forma amôrfã, como se houvesse uma "fusão" das moléculas, na conceituação de Flory (1957). Que o estudo da birrefringência é um meio hábil para determinar é ponto pacífico, Vidal (1964), Vidal e Bozzo (1966), Banga e Szabó (1965) afirmam " Submicroscopic inspection of the longitudinal fibrillar arrangement in the molecules of the last named proteins is a great help in studying configurational changes..... Colagenous fibers are instructive in this respect, since they display a molecular birefringence the changes of which indicate changes occuring in the configuration or spatial reticulation".

Ora, as modificações de concentração de massa realmente comprovam que houve modificações na configuração macromolecular do feixe de colágeno.

Pode-se, com base nos índices de refração determinados, calcular as concentrações em pêso por volume como um índice de hidratação do feixe. Usa-se para o cálculo, a fórmula:

$$C_{pr} = \frac{n_o - n_a}{0,0018}$$

segundo Ross (1961) e que nos dá em porcentagem, o pêso das substâncias que compõem o feixe. Para o cálculo da porcentagem de água, usa-se a fórmula:

$$C_{ag} = 100 - 0,75.C_{pr}$$

0,75 é o volume específico de proteínas.

n_o = índice de refração do objeto em estudo

n_a = índice de refração da água.

Os valores encontrados com estes dados, usando-se as médias dos índices de refração, são: - Tendão Normal. dire-

C_{pr} = 96,5% de material mais representativo no feixe de colágeno e que se pode aceitar como proteína, além de polissacarídeos.

eixo do feixe.

C_{pr} = 99,3% de proteína e polissacarídeos.

C_{ag} = 25,52% de água.

Para os valores obtidos com as médias dos tendões tratados, tem-se:

Direção "alpha"

C_{pr} = 100,3%

C_{ag} = 24,78%

Direção "gama"

C_{pr} = 102,5%

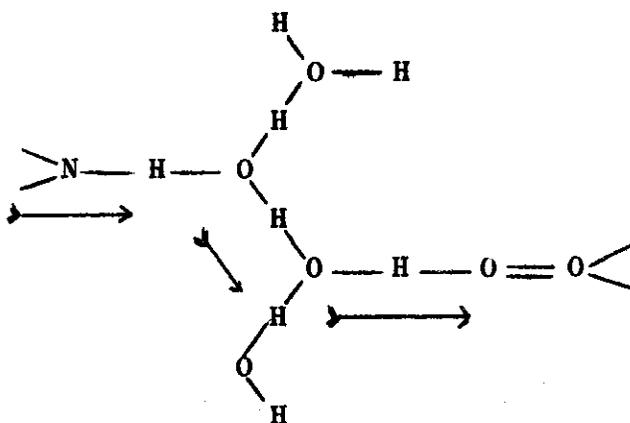
C_{ag} = 23,12%

Estes dados comprovam a existência de modificações estruturais não só das cadeias proteicas do feixe de colágeno e dos mucopolissacarídeos, como também da água que é muito importante para a estabilização da macromolécula de colágeno.

Tanto é assim que Hippell e Harrigton (1960), estudando o papel da água na estabilização da estrutura de colágeno, cita os estudos quantitativos das modificações dos difra

togramas do raio X em função do grau de unidade das amostras. Estes estudos demonstraram que "the preliminary sorbed water (13 to 25 g/100g collagen)" está ligada à estrutura por alguma maneira sistemática. Ora, as cifras obtidas na presente pesquisa, podem muito bem serem consideradas dentro dos dados citados; e este fato demonstra não só as possibilidades da microinterferometria como ainda sua vantagem, uma vez que com ela se pode determinar as concentrações em função da direção do feixe

Estudos posteriores de Harrington e Hippel (1961) e de Berendsen e Migchelsen (1965) comprovam que a água participa da estrutura do colágeno. Berendsen e Migchelsen (1965), estudando a ressonância protônica, estabelecem que as moléculas de água de hidratação do colágeno (poder-se-ia chamar até de água de cristalização) se orientam na cadeia polipeptídica; dá-se a seguir, o esquema copiado de Berendsen e Migchelsen (1965); nesse pode-se ver que as moléculas de água participam na formação de pontes de hidrogênios.



= Esquema copiado de Berendsen e Migchelsen (1965).

Analisando esta estrutura, pode-se compreender porque se têm maior concentração de massas no sentido longitu-

dinal, direção gama, do feixe e maior concentração de água no sentido transversal ao feixe, direção "alpha".

Em primeiro lugar, por causa do alinhamento da cadeia central de ligações amídicas da proteína que se constitui obviamente, na maior condensação de massas com orientação molecular. Em segundo lugar, as pontes de hidrogênio formadas entre a água e as cadeias proteicas dão uma concentração relativa, de água, maior na direção "alpha".

Observa-se, no esquema, dirigindo a atenção para um grupamento >N de uma cadeia até uma carbonila O=C< de outra cadeia, na direção "alpha", há um número relativo maior de moléculas de água.

Este fato realça os dados e comentários já feitos com relação à organização macromolecular.

Após a injeção de histamina, ocorreram realmente, modificações morfológicas, histoquímicas e sub-microscópicas. Como explicar estas transformações constatadas, será o próximo passo desta discussão.

*

MECANISMO DE AÇÃO DA HISTAMINA

A histamina poderá agir fundamentalmente através de três mecanismos:

1) Ação direta sobre os feixes provocando modificações na sua homeostasia.

2) Ação indireta através de modificações metabólicas do tecido conjuntivo.

3) Ação direta sobre os feixes e, concomitantemente sobre o metabolismo do tecido conjuntivo através dos seus elementos celulares.

Se a discussão desta pesquisa fundamentou-se até este ponto, sobre as evidências diretas do experimento, daqui por diante terá que se fundamentar em evidências indiretas para se compreender as relações fisiológicas entre a histamina e o tecido conjuntivo. Isto porque as transformações dos feixes de colágeno não podem ser entendidas a não ser como uma função da sua estrutura e seu metabolismo, enfim, dentro dos seus fenômenos de regulação e controle.

Mecanismos de regulação e controle dos feixes de colágeno já vêm sendo propostos. Schmitt (1959), por exemplo, propõe: "The mechanism of fibrogenesis may be very complex, involving process of activation and homeostatic control of such processes so as to facilitate fibrogenesis when need (as in wound repair) and to prevent excessive fibrilogenesis".

Vidal (1964) expôs suas conclusões sobre um possível mecanismo de regulação do feixe de colágeno, dizendo:.. "Na dependência das variações de estímulos funcionais de natureza mecânica e bioquímica, estabelecem-se transformações lo-

cais (variações metabólicas, como as variações na concentração de mucopolissacarídeos ácidos e de precursores de colágeno), que agirão no sistema como um dispositivo de retroação ("feed-back") êste dispositivo agirá nos fatores de entrada do sistema fibroblástico determinando modificações que manterão a homeostasia". O autor contudo, não adiantou detalhes a respeito das "mensagens" bioquímicas e mecanoquímicas que compõem a retroação do sistema; o que foi feito mais recentemente, Vidal (1966). Tentar-se-á nesta discussão, fazê-lo novamente, como também interpretar a ação da histamina dentro do esquema.

A estruturação de um mecanismo biológico ou artificial, impõe, de uma maneira geral, um resultado constante ou tendente a constante. Êste resultado é a "finalidade" do mecanismo, é o efeito útil determinado pela estruturação.

Para os feixes de colágeno o efeito útil é a sustentação, cujas características anátomo-fisiológicas é mantida pelos processos de regulagem e contrôle do sistema.

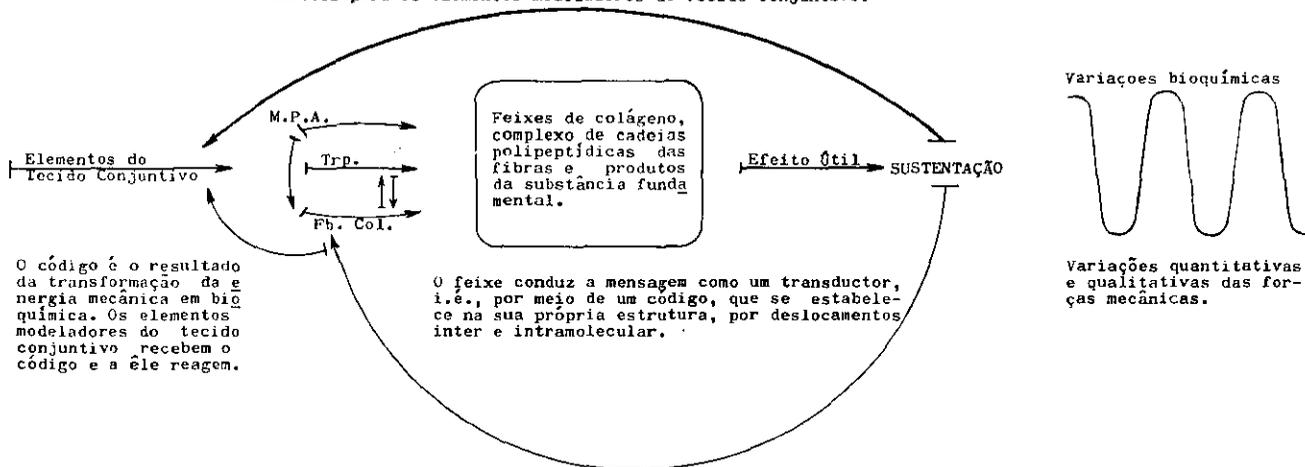
O esquema de regulagem e contrôle biocibernético, aqui apresentado, foi inspirado na obra de Latil (1959). Convém seguir a exposição, consultando o esquema I.

O feixe de colágeno pode ser considerado em efector cujo efeito útil, sustentação, é submetido a variações quantitativas e qualitativas, de natureza bioquímica e biomecânica às quais o sistema deverá adaptar-se para obter a continuidade funcional, que é seu determinismo biológico.

As variações de natureza biomecânica são detectadas pelos próprios feixes de colágeno que, a par de realizarem uma função biomecânica, também agem como transductores, transformando energia mecânica em mensagem de natureza bioquímica para os elementos modeladores do tecido conjuntivo.

A mensagem nasce no próprio feixe de colágeno, a

As transformações bioquímicas locais constituem-se em mensagens diretas para os elementos modeladores do Tecido Conjuntivo.



Esquema I

Esquema biocibernético do feixe de colágeno
M.P.A. - Mucopolissacarídeo ácido
Trp.- Tropocolágeno. Fb.Col.-Fibras de colágeno (cadeia proteica)
Original de VIDAL, B.C.

custa de deslocamentos inter e intramoleculares que constituem o código.

O feixe de colágeno, nestas condições, age como um transductor, uma vez que conduz u'a mensagem cujo código nasce da transformação de um tipo de energia, mecânica em outra de natureza bioquímica.

As variações bioquímicas, pela sua natureza, agem por si como elementos de mensagem retroativa.

Estas qualidades expostas conferem ao feixe de colágeno o caracter de um efector de tendência com retroação positiva.

A sustentação que é realizada pelos feixes de colágeno, como seu efeito útil mais provável está sujeito em primeiro plano, às variações mecânicas.

Consequentemente, a idéia da transformação da energia mecânica em bioquímica, será justificada em primeiro lugar.

O feixe de colágeno, dada a sua organização macromolecular, tem características biofísicas para suportar grandes forças de tração - Schmitt (1959).

Não se deve esquecer que os feixes de colágeno são na realidade um complexo de fibras constituídas por cadeias polipeptídicas e elementos da substância fundamental - Gebhardt (1960) - dentre as quais os mucopolissacarídeos ácidos, que se constituem em macromoléculas orientadas com os seus grupos polares negativos interagindo com os positivos da cadeia proteica, Vidal (1963), Vidal (1964).

Devido a esta organização macromolecular, os feixes permitem deslocamentos intermoleculares, entre as moléculas de mucopolissacarídeos ácidos e as das moléculas proteicas.

As forças de tração promoveriam êstes deslocamen-

tos intermoleculares. Estes deslocamentos geram o aparecimento de grupos polares livres, reativos, que serão o código da mensagem. Há dados sugestivos de que a tração promove o aparecimento de grupos polares reativos, foram notadas modificações tintoriais em feixes de colágeno submetidos à tração; assim, Gibson (1965) diz " The most astonishing discovery in the histological studies however, has been the fact that stretched collagen bundles changes their staining reaction". But even more fascinating is that this reaction is not immediately reversible". A força para isso não precisa ser forte.

O autor explica o fato afirmando que parece haver u'a mudança na estrutura molecular, permitindo combinações com o corante. Com relação às possíveis implicações, Gibson et alii (1965) continua: "It is interestint to speculate for example, that this molecular change under tension my be the biochemical stimulus to incresed production of collagen and gradual " stretching of skin". O mesmo autor, Gibson (1965), reconhece a presença de mucopolissacarídeos ácidos nos feixes de colágeno e relaciona a existência de fibroblastos e suas extensões citoplasmáticas com a atividade metabólica do feixe.

Ora, esta idéia é praticamente a que se esposa nesta tese, com explicação mais detalhada.

Justificando ainda, a possibilidade dos deslocamentos intermoleculares, adicionam-se os seguintes fatos:

Há uma estreita dependência entre o tipo de estrutura fibrosa e o ambiente bioquímico - Gebhardt (1960), Vidal - (1964) e segundo Schmitt (1957), o ambiente bioquímico agiria ionizando cadeias laterais, aumentando a reatividade dos grupos laterais, os deslocamentos intermoleculares promovem o aparecimento de tais grupos reativos laterais que são uma parte do código biocibernético.

Os deslocamentos tornam-se possíveis graças às re-

lações estruturais entre as macromoléculas em consideração; es tá provado que os mucopolissacarídeos ácidos, guardam relações estruturais de orientação, participam das propriedades biofísicas do feixe e desde a fibrogênese orientam-se proporcionando uma atmosfera adequada para a gênese e o amadurecimento dos feixes, como já foi descrito nos trabalhos do autor desta pesquisa.

A idéia de que há deslocamentos intramoleculares fundamenta-se, de um lado, nas diferenças entre difratogramas de fibras de colágeno submetidas e não à tração, Schimtt . . . (1959). Ora, estas diferenças só podem apresentar modificações na macromolécula de cadeia proteica através de deslocamentos.

A influência de forças mecânicas sobre proteínas foi estudada por Butjargin e Abagjan (1964) que estudaram a formação de radicais livres sob a influência de forças e a migração da valência livre, nesta classe de compostos. Os autores investigaram a natureza da ação inicial e os processos secundários que ocorrem por causa de reações mecanoquímicas nas proteínas, melhor dito ainda pela destruição mecânica de moléculas proteicas.

Os radicais livres foram estudados pela ressonância do "spin" eletrônico. Uma das conclusões a que chegaram os autores é de que a destruição pode ser considerada como uma dissociação de macromoléculas catalizadas por ação mecânica. Nu ma molécula mecanicamente submetida a esforço, deformação, a distância entre os átomos sofre uma modificação. Estabelecem, ainda, que as reações mecanoquímicas são da mesma ordem de grandeza que as radioquímicas.

Ora, tais fatos resultaram de ações mecanoquímicas de grandeza suficiente para promover destruição. Contudo são suficientes para mostrar o fenômeno que propomos para fôr-

ças menores, fisiológicas. Ainda mais, permitem prever verdadeiras migrações de massas nos processos destrutivos iniciais.

Como parece haver uma equivalência entre os efeitos das diversas energias sôbre o mesmo substrato, no caso em fôco, o colágeno, o achado da presente tese, aumento de massas sêcas, também é mais de um dado de que deslocamentos devam ocorrer por ações mecânicas e bioquímicas.

Houck (1962) constatou que a destruição de colágeno, no processo inflamatório, era acentuado por pequenos esforços.

O que de um lado se pode explicar pela ação mecânica sôbre cadeias proteicas-polissacarídeas já bioquimicamente alteradas e já sem regulagem e contrôle adequados e, de outro lado como uma evidência indireta das ações mecanoquímicas.

Ações mecanoquímicas também foram estudadas por Vorob'ev (1964), sob o título "Modificações da conformação de macromoléculas e mecanoquímica". O autor, usando músculo e colágeno, constatou que pequenos esforços externos estabilizam a conformação de macromoléculas proteicas, enquanto que os esforços maiores estabilizam os espiralamentos alongados. Sugere o autor que há reações cooperativas específicas entre grupos laterais das cadeias de biopolímeros. Estas reações, segundo o mesmo autor, resultam em alterações de conformação de cadeia e suas deformações.

Também êstes fatos apoiam a hipótese aqui apresentada de que hajam deslocamentos intra e intermoleculares na cadeia, como também oferecem as bases para se interpretar a ação da histamina sôbre as estruturas que contém colágeno.

Com a rubrica "retroação por mensagens bioquímicas" quer se referir às mensagens diretas tais como a concentração de precursores de colágeno e a de mucopolissacarídeos ácidos. Tan-

to assim que em casos de patologia experimental do tecido conjuntivo como no latirismo, autores como Smith e Shuster (1962) dizem: " Os dados sugerem que o aumento de colágeno solúvel, nos embriões latíricos são, na sua grande maioria, de síntese recente, a impossibilidade do colágeno recém-formado (precursores do colágeno fibrilar) em formar fibras pode ativar um mecanismo de realimentação (retroação) que aumenta o grau de síntese do colágeno".

Da mesma forma alterações metabólicas que atinjam os componentes da substância fundamental podem modificar a homeostasia dos feixes; é bem conhecida a ação dos hormônios, v.g. a ação relaxina e outros hormônios sexuais.

Estudos sôbre a destruição dos feixes de colágeno em tendão, Vidal (1964), levaram à conclusão de que a desorientação e desagregação dos mucopolissacarídeos ácidos agem como u'a mensagem retroativa que porá em função um mecanismo de eliminação e substituição do feixe de colágeno.

Pode-se, pois, analisar a ação da histamina dentro dêste esquema desde que sua presença nos tecidos promove a perda de orientação dos mucopolissacarídeos ácidos, perda de orientação das moléculas da cadeia proteica de colágeno e deslocamentos de massa.

**
*

ACÇÃO DIRETA DA HISTAMINA SÔBRE OS FEIXES DE COLÁGENO, MODI
FICANDO SUA HOMEOSTASIA

Com esta hipótese quer-se discutir a possibilidade de uma ligação de natureza química entre a molécula de histamina e as que compõem o feixe de colágeno.

Dentro do esquema biocibernético que se imaginou, a histamina não seria uma substância mensageira; ela provocaria modificações na orientação e estruturação do feixe e estas é que seriam um código para os elementos celulares do tecido conjuntivo. Estes elementos promoverão as transformações necessárias para o restabelecimento das condições homeostáticas, tais como reutilização do colágeno, síntese e orientação de mucopolissacarídeos ácidos, tal como discutir-se-á mais adiante.

Rocha e Silva (1961), como resultado de pesquisa sobre a natureza química dos receptores para a histamina, crê na presença de grupos carbonílicos $=C=O$, no substrato, que poderiam formar ligações transitórias com o grupo amínico do anel histamínico. Outra dedução deste autor é de que o anel imidazólico de amino ácidos, poderia também comportar-se como um grupo receptor através do radical $=NH$.

Tais radicais existem nas moléculas dos feixes de colágeno propiciando, pelo menos teoricamente, pontos de ligação para a histamina, que poderia agir rompendo as pontes de hidrogênio, estabilizadoras das moléculas de colágeno.

A inexistência de informações a respeito desta hipótese obriga a estudos comparativos com substâncias que contém grupamentos $=NH_2$; dentre estas salienta-se a uréia pelo número de pesquisas a respeito de sua acção sobre o colágeno.

Muitos, como Banga e Szabó (1965), Banga e Baló .. (1965) crêem que a uréia promove a ruptura das pontes de hidrogênio e assim rompe as ligações responsáveis pelo arranjo longitudinal das fibras. Outros, como Levy e Magoulas (1961) afirmam que não existem bases experimentais para a conclusão de que a uréia rompe as pontes de hidrogênio, o efeito da uréia seria mais o de quebrar interações hidrófóbicas.

SHAW (1961) comunicou que a uréia e seus derivados apresentam uma microcristalização sobre o colágeno de tendões; os exames dos diafratogramas de raio X revelaram uma expansão dos espaçamentos equatoriais, o que significa que há uma ligação da uréia na malha de colágeno com distâncias de $4,7 \text{ \AA}$ ao longo da fibra. Shaw e Helgerson (1962) consideram que a cristalização, no colágeno, de substâncias com capacidade de formar pontes de hidrogênio sugere que o acesso à estrutura interna do mesmo seja possivelmente acompanhado por um intumescimento. Os autores pesquisando a ação de diferentes sais e substâncias orgânicas dizem, com referência à uréia, que o intumescimento só aparecia com o uso de soluções cujas concentrações excediam a 1 M. A microcristalização da uréia é explicada pela formação de pontes de hidrogênio, em substituição à água que originariamente está presente nas cadeias espirais polipeptídicas de colágeno.

Nestes trabalhos em questão, o autor principal mostra que os derivados da uréia e as amidas podem provocar os mesmos efeitos sobre o colágeno.

A cristalização orientada sobre o colágeno pode ocorrer também com dióis, Shaw e Rost (1962), Shaw e Schulte ... (1964), Shaw e Zarins (1965), como da mesma forma, com compostos aromáticos dihidroxilados, Shaw e Christensen (1963), os quais ligam-se ao colágeno através de pontes de hidrogênio.

Já foi salientada a hipótese de que a histamina, tendo radicais NH poderá combinar-se com grupamentos imidazólicos e com os carbonílicos. Pode-se imaginar, então, a formação de pontes de hidrogênio pela histamina, com o deslocamento da água do colágeno e seu intumescimento. Na presente pesquisa encontrava-se nos feixes de colágeno, diminuição da birrefringência e diminuição da concentração da água, como sóe acontecer pela ação da uréia.

Aparentemente caberia deduzir-se que a histamina agiria de modo semelhante não só à uréia, mas também aos compostos hábeis a formar pontes de hidrogênio com as cadeias do colágeno.

Contudo não se poderia deixar de considerar que as constatações feitas sobre a ação da uréia têm sido levadas a efeito "in vitro" e com uma elevada concentração de uréia. Além do mais, faltam informações sobre os efeitos da uréia "in vivo" como são carentes dados referentes aos seus efeitos "in vivo" e em doses diminutas, comparáveis à usadas para a histamina, na presente pesquisa. Some-se à estas considerações a realidade de que "in vivo" os feixes de colágeno fazem parte de um sistema biológico para cuja homeostasia participam os componentes da substância fundamental através dos quais difundem-se as substâncias que têm acesso ao feixe. Desta forma, bem poderia ser diferente a ação da uréia e seus derivados "in vivo" justamente pelas suas possíveis interações com os componentes da substância fundamental.

Um dado importante até agora não considerado, a relação de orientação macromolecular entre mucopolissacarídeos ácidos e o colágeno, deve entrar na discussão, uma vez que as partes alteradas do tendão acusavam perda da sua orientação macromolecular. Este fenômeno poderia ser devido a um "deslocamento"

dos mucopolissacarídeos ácidos pela histamina, como resultado de reações semelhantes às da uréia. Já citou-se trabalhos os quais mostram que compostos orgânicos portadores de hidroxilas podem formar pontes de hidrogênio e apresentarem cristalização orientada no colágeno. Vidal (1963)(1964) descreve a existência de uma ligação electrostática entre os grupos polares negativos dos mucopolissacarídeos ácidos e os positivos das cadeias de colágeno; êste autor não tecia considerações em torno da existência de pontes de hidrogênio ligando a cadeia do polisacarídeo com a proteica. É possível que exista ligação dêste tipo, desde que, como já foi citado, compostos hidroxilados podem formar pontes de hidrogênio. Os mucopolissacarídeos ácidos, através de suas hidroxilas, poderiam formar pontes de hidrogênio; esta concepção de um lado fortalece a idéia de sua orientação macromolecular e, de outro, permite a hipótese da ruptura ou substituição das ligações desta natureza para compostos como a uréia e a histamina. Cabem, contudo, as mesmas restrições já feitas em relação aos efeitos da uréia sôbre a cadeia proteica colagênica.

Em condições fisiopatológicas já se relatou a deposição de substâncias no colágeno, alterando-o.

Milch (1960)(1961)(1962) es(1963), estudando a alcaptonúria e o efeito de certos metabolitos intermediários sôbre o colágeno, mostra a efetividade de reações entre substâncias produzidas no organismo vivo e o colágeno.

A existência de reações entre metabolitos intermediários e o colágeno abre caminho para a segunda hipótese para explicar os efeitos da histamina sôbre os feixes de colágeno, isto é, por uma ação indireta, através de modificações metabólicas do tecido conjuntivo, pois que as transformações do colágeno com a idade, as estudadas por Milch (1963), ocorrem com va-

riações quantitativas e qualitativas de polissacarídeos da substância fundamental.

**

*

AÇÃO INDIRETA ATRAVÉS DE MODIFICAÇÕES METABÓLICAS DO TECIDO

CONJUNTIVO

Nesta hipótese concebe-se a histamina como uma substância "mensageira". A histamina aplicada, ou fisiologicamente liberada, seria uma informação para certos elementos celulares do tecido conjuntivo. Poder-se-ia aceitar ainda, a histamina, como uma substância hormonoide, com ação sobre o tecido conjuntivo e, portanto, sobre os componentes vasculares de mesma natureza.

Tais funções da histamina cabem dentro do esquema biocibernético proposto. Ela seria um dos produtos bioquímicos, com atividade mensageira, isto é, sua presença e variações de concentração, como também a cronologia do seu aparecimento, poderiam provocar modificações nos fatores de entrada do sistema de síntese e manutenção dos feixes de colágeno.

A injeção de histamina, só ou acompanhada de heparina, é capaz de induzir transformações morfológicas e histoquímicas no tecido conjuntivo, fato constatado nesta pesquisa.

Riley (1962) discute fatos semelhantes e atribui à histamina uma atividade preparadora sobre as células do tecido conjuntivo.

Higginbotham (1959) se refere à uma diminuição da viscosidade ao redor de mastócitos. Kwaan (1964), realizando um estudo histoquímico da atividade fibrinolítica e conteúdo de proteases do mastócito conclui que existe uma atividade fibrinolítica e proteolítica baixa nestas células isoladas, bem como nos seus grânulos. Jelsall, citado por Perlmutter (1963) diz que a histamina reduz a viscosidade do ácido hialurônico.

Kahlson et alii (1962) comunicaram que ocorre uma ativação da descarboxilase da histidina como parte de vários tipos de crescimentos teciduais normais ou malignos. Especialmente afirmaram que, no tecido de granulação, promovia o aumento de colágeno acelerando a cura.

Os trabalhos de Kahlson são citados e discutidos por Burkhalter (1965), Leblanc et alii (1962), também por Mackay et alii (1961), podendo-se concluir deles que a atividade da histamina não é tão simples, confinando-se somente a aumentar a permeabilidade vascular no início do processo inflamatório.

Pode-se relacionar estes dados, considerando a importância dos mucopolissacarídeos ácidos na substância fundamental e nos feixes de colágeno, tanto quanto a importância daquêles e dêstes na estruturação das paredes vasculares.

Entre os mucopolissacarídeos ácidos e as cadeias de colágeno existe uma estreita relação, desde a sua síntese, como já foi discutido por Vidal (1964); nos fenômenos de reparação de tendões, por exemplo, existe uma sequência cronológica na composição do feixe; primeiro são elaborados os mucopolissacarídeos ácidos e, somente cêrca do sétimo dia é que se inicia o aumento da concentração de colágeno - Dunphy e Udupa (1955), Fernando e Movat (1963) e Vidal (1964) - êste último determinou que no processo de fibrogênese há uma orientação macromolecular dos mucopolissacarídeos ácidos, antes mesmo do aparecimento da birrefringência dos feixes de colágeno.

Os polissacarídeos ácidos participam da estruturação e das propriedades de permeabilidade da substância fundamental - Engel et alii (1961) estudaram a capacidade de fixação de anions pelo tecido conjuntivo da derma e cartilagem. Empregaram como método de estudos, medidas de potencial com as quais elabo

raram curvas de titulação do tecido conjuntivo em presença de soluções de diferentes ions. Concluíram que a distribuição de anions e cations inorgânicos dependem da estrutura delicada ("fine structure") de um sistema bifásico em que se organiza a substância fundamental do tecido conjuntivo. Os autores tecem considerações sôbre a importância fisiológica destes fenômenos, mormente no que se refere à distribuição de todos os anions e cations, muito dos quais derivam do metabolismo celular.

Catchpole et alii (1963) levaram a efeito estudos análogos estudando a fixação de ions e outras propriedades do tecido conjuntivo e descrevem que a histamina fixa-se aos coloides do tecido conjuntivo e de maneira mais forte que os ions inorgânicos e têm a capacidade de deslocar o sódio e outros cations de suas combinações coloidais. Estes autores, com referência às membranas basais dizem: "Physiological reactions involving the ground substance invariably affect the basement membrane".

Se a histamina é hábil para induzir alterações na substância e nos feixes de colágeno, será também capaz de afetar as membranas basais vasculares, comprometendo os fenômenos normais de permeabilidade, certamente aumentando-a.

Como era constatado, já descrito e comentado, a histamina promovia modificações celulares, histoquímicas e estruturais nos polissacarídeos ácidos, o que está plenamente de acôrdo com os achados, as descrições e opiniões dos autores, em concordância mesmo com os relatos da sua presença em tecidos em proliferação.

A permeabilidade podia estar aumentada por uma despolimerização, degradação dos compostos em questão pela atividade de fatores enzimicos existentes nos próprios tecidos conjuntivos.

Não fôra assim e não ter-se-ia a diminuição da vis

cosidade do ácido hialurônico pela influência da histamina, bem como as diminuições de viscosidades ao redor de mastócitos em desgranulação; tais transformações não podem ser devidas à histamina, que não é um enzimo. A diminuição da viscosidade por causa da desgranulação dos mastócitos não pode ser devida a uma atividade enzimica, os mastócitos, êles mesmos, estão desprovidos de atividades digestivas intensas - Kwaan (1964).

A existência de fatores que promovem a degradação do ácido hialurônico já foi constatada em granulomas, nos quais também foi verificado um aumento da capacidade formadora de histamina. Parece pois estarem êsses fenômenos associados a um mecanismo de substituição de elementos da substância fundamental do tecido conjuntivo.

Ao se encarar as modificações dos mucopolissacarídeos ácidos como sendo estimuladas pela histamina, não só se justifica a sua função de substância mensageira, hormonoide, mas concatenam-se dados importantes para a compreensão do seu papel fisiológico dentro de um esquema biológico do tecido conjuntivo que teria a renovação de certos componentes acelerada, estimulada por esta amina.

Na presente pesquisa, o estudo do histograma da FIG. 15, mostra que com o decorrer do tempo há um aumento da birrefringência e o estudo da regressão linear dos retardos ópticos permitiu aceitar como verdadeira a hipótese de que as médias crescem com o correr do tempo, tendendo para a normalidade. Como já se comentou, a perda da birrefringência denuncia a perda de orientação macromolecular do colágeno no feixe, primeiro indício de sua degradação. O retorno da birrefringência à normalidade revela um processo de recuperação da ordenação molecular própria do colágeno e compatível com sua integridade funcional. Êste fato pode ser explicado através de um mecanismo de reutilização do colágeno, fenômeno já demonstrado por

Klein e Weiss (1965). Além do que eram patentes as transformações morfológicas e histoquímicas que revelam uma atividade de síntese de précursores do feixe. O aumento da metacromasia, as modificações morfológicas, o aumento do número de fibroblastos apoiam esta dedução e o aumento da elaboração de precursores dos feixes, estão de acôrdo com os autores que conseguiram mostrar a relação da histamina com crescimento tecidual, em especial o aumento de feixes de colágeno.

Houck (1961 e 1962) mostrou que no processo inflamatório há uma diminuição de colágeno, responsabilizando uma collagenase tecidual pela remoção do colágeno, Vidal (1963) supôs que nas doenças periodontais inflamatórias haveria a presença de collagenase - Fullmer e Gibson (1966) mostraram que em gengivas inflamadas há collagenase, fato também demonstrado por Beutner et alii (1966, Pensou-se, inicialmente, que a histamina provocasse a formação de collagenase para a destruição dos feixes de colágeno - Vidal (1966).

Os dados do presente trabalho não confirmam o pensamento supra expôsto, pois que constatou-se, nas partes alteradas dos feixes de colágeno, um aumento de massa sêca e de índice de refração.

Se houvesse uma atividade enzimica dever-se-ia ter uma diminuição de massa e de índices de refração, de sorte que a possibilidade de existência de uma atividade collagenolítica, nesta fase inicial do processo inflamatório, pode ser apenas a ceita como hipotética.

Os dados numéricos permitem aceitar sòmente uma desordenação macromolecular como início de processo de destruição do feixe, tanto para o lado dos mucopolissacarídeos ácidos como para o lado das cadeias de colágeno. Como permite o pensamento de que há realmente um mecanismo de reutilização do colágeno

e não síntese de novo, dentro do conceito de Klein e Weiss (1965).

Desta forma, o aumento de permeabilidade seria uma consequência imediata de transformações metabólicas do tecido conjuntivo, transformações estas estimuladas pela histamina.

*

7 - CONCLUSÕES

A injeção de histamina provocava dissociação, fragmentação e formação de massas irregulares nos feixes de colágeno.

Ocorreriam modificações morfológicas nos fibroblastos que se apresentavam com aspecto mais ovóide, intumescidos, alguns até condroides.

Os feixes apresentavam-se em geral mais metacromáticos. O citoplasma das células fibroblásticas também exibiam maior quantidade de material metacromático em seus citoplasmas. Havia maior quantidade de grupos reativos negativos ou então, maior quantidade de mucopolissacarídeos ácidos.

O uso de corifosfina para detectar mucopolissacarídeos ácidos revelou um aumento de material fluorescente nos tendões injetados; nestes havia aumento geral de mucopolissacarídeos ácidos.

As zonas fragmentadas, dissociadas e intumescidas apresentavam uma concentração de mucopolissacarídeos ácidos mais elevada.

Com relação às células fibroblásticas, confirmam-se os resultados da metacromasia.

As observações do dicroísmo revelavam alterações da orientação macromolecular dos mucopolissacarídeos ácidos em relação à cadeia de colágeno.

A birrefringência dos feixes de colágeno, nas partes alteradas diminui, revelando perda de orientação molecular e desagregação parcial do seu caráter "macrocrystalino".

A tendência, nas partes afetadas dos feixes, a re-

cuperarem os valores de birrefringência, próximos da normalidade, revelam uma recuperação gradual da orientação macromolecular característica do colágeno.

As medidas interferométricas revelaram:

Os índices de refração dos feixes de colágeno, nas condições da presente pesquisa são, para os tendões normais: .. 1) na direção alpha, transversal ao feixe, 1,5065 e - 2) na direção gama, paralela ao longo eixo do feixe, 1,5117. Estes são os valores médios.

Para as partes alteradas dos feixes sob a influência da histamina, os índices de refração davam as seguintes médias: - 1) na direção alpha, 1,5135 e - 2) na direção gama 1,5174.

A histamina provocou um aumento dos índices de refração em ambas as direções do feixe. Estes resultados também revelam alterações na orientação das macromoléculas do feixe.

Com os índices de refração achados, calculava-se as concentrações de água no feixe de colágeno.

Tendão normal, direção alpha: 27,62% de água; direção gama: 25,52% de água.

Tendão injetado, direção alpha: 24,78% de água e direção gama: 23,12% de água.

Havia uma diminuição de água nas partes alteradas dos tendões.

Massas secas: com os dados interferométricos calculavam-se as massas secas:

Tendão normal, média das massas secas na direção alpha: $13,5541 \cdot 10^{-8}$ g e média das massas secas na direção gama... $13,8712 \cdot 10^{-8}$ g.

Tendão tratado, média das massas secas na direção alpha: $14,0504 \cdot 10^{-8}$ g. e na direção gama: $14,3423 \cdot 10^{-8}$ g.

O tratamento estatístico revelou que as massas sêcas, nas partes alteradas, aumentavam, o que está de acôrdo com a diminuição da concentração de água.

Os dados interferométricos conformavam os resultados encontrados por outros métodos. Havia nos tendões tratados partes alteradas nas quais se encontrava desarranjo macromolecular do colágeno e de água de "cristalização" na fibra de colágeno.

**

*

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHMAN, C.H. and Ellis, E.E. - Fluorescence of bone - Nature, 206: 1328-1331, 1965.
- BANGA, I., Mauláth-Palágyi, I. und Jobbágy, A. - Fluoreszieren de Komponenten in Elastin - Acta Phys. Acad. Sci Hung, 26: 305-312, 1965.
- _____ and Szabó, D. - Examination of collagen fibers following treatment with Lyotropic agents. Acta Morph. Acad. Sci. Hung., 13: 255-261, 1965.
- _____ and Baló, J. - Correlation between crosslinkages, steric structure and digestibility of collagen. Bioch. Zeitsch., 342, 330-336, 1965.
- BERALDO, W.T. and Rocha e Silva, M. - Biological assay of antihistaminics, atropine and antispasmodics upon the guinea pig gut. J.Pharm.Exp.Ther., 97: 388-398, 1949.
- BERENDSEN, H.J. and Migchelsen, C. - Hydration structure of fibrous macromoles - Ann. New York Acad.Sci., 125: 365-379, 1965.
- BEUTNER, E.H., Triftshauser, C. and Hazen, S.P. - Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 121: 1082-1085, 1966.
- BURKHALTER, A. - Histamine and Grow. Feder.Proc., 24: 134-135, 1965.
- BUTJAGIN, P. and Abagjan, G. - Formation of free radicals under the influence of mechanical forces on proteins and migration of free valence. Abhandlungen der

Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin n^o
6-1964 (Klasse für Medizin).

- CATHPOLE, H.R. et alii - Fixation d'ions, échanges d'ions et autres propriétés colloïdales du tissu conjonctif. in, "Colloque sur la biochimie du tissu conjonctif" Publiés sur la direction de Boulanger, P. Jayle, M.F. et Roche, J. - Masson et Cie., 1963 - Paris.
- DAVIES, H.G. - The determination of mass and concentration by interferometry. in, General cytochemical methods. v. 1 - editor Danielli, F.J. - Academic Press Inc. New York, p. 57-158, 1958.
- DUNPHY, J.E. and Udupa, K.N. - Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New Engl. J.Med., 253: 847-851, 1955.
- ENGEL, M.B. et alii - Binding of anions by connective tissue: dermis and cartilage. Amer.J.Phys., 201: 621-627, 1961.
- EPPINGER, H. - Patologia de la Permeabilidad. Editorial Labor S/A - Barcelona, Madrid, p. 93, 1952.
- FERNANDO, N. and Movat, Z. - Fibrillogenesis in regenerating tendon. Labor.Invest., 12: 214-229, 1963.
- FLOREY, H. - General Pathology - W.B.Saunders Company-Philadelphia and London, p. 23-33, 1958.
- FLORY, P.J. - Crystallinity and dimensional changes in fibrous proteins. J.Cell.Comp.Physiol., 49:(sup.1): 175-183, 1957.
- FUGIMORI, E. - Ultraviolet light irradiated collagen macromolecules. Biochemistry, 5: 1034-1040, 1965.
- FULLMER, H.M. and Gibson, W. - Collagenolytic activity in gingiva of man. Nature, 209: 728-729, 1966.
- GEBHARDT, D.O.E. - A biochemical study on the development of collagen. Academisch Proefschrift. Amsterdam, 1960.

- GIBSON, T. - Biomechanics in plastic surgery. in "Biomechanica and related bio-engineering topics". Proceedings of symposium held in Glasgow, september 1964. Pergamen Press, 1965.
- _____, Kenedi, R.M. and Craik, J.E. - The mobile micro-architecture of dermal collagen - A bio-engineering study. Brit.J.Surg., 52:764-770, 1965.
- GROSS, J. and Lapiere, C.M. - Collagenolitic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. Proc.Nat. Acad.Scien., 48: 1014-1022, 1962.
- HALE, A.J. - The interference microscope in biological research. E. & S. Livingstone Ltd., 1958 - Edinburg and London.
- HARRINGTON, W.F. and Hippel, P.H. - Formation and stabilization of the collagen-fold. Arch.Biochem.Bioph., 92: 100-113, 1961.
- HEILMEYER, H.C.L. e Kahler, H.J. - La inflamacion. Su regulacion y tratamiento. Ediciones Toray S/A - Barcelona, 1964.
- HIGGINBOTHAN, R.D. - The mast cell. in, Polysaccharides in biology. Springer, G.F. - editor. The Josiah Macy Jr., Foundation, 1959.
- HIPPEL, P.H. and Harrington, W.F. - The estructura and stabilization of the collagen macromolecule. Protein structure and function. Brookhaven Symposia in Biology. nº 13, 1960.
- HOUCK, J.C. - The effect of local necrosis upon the collagen content of uninjured distal skin. Surgery, 61: 770-773, 1962.
- _____ and Jacob, R.A. - The chemistry of local dermal inflammation. J.Invest. Dermatol., 36: 451-456, 1961.

- HOUCK, J.C. and Jacob, R.A. - Connective tissue II: Distant dermal collagen response to local inflammation. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 106:145,-147, 1961
- _____ et alii - Dermal chemistry of local necrotic ulceration. Surgery, 51: 382-390, 1962.
- _____ et alii - The dermal chemical response to alkali injury. Surgery, 51: 503-507, 1962.
- KAHLSON, G., Rosengren, E. and Steinhardt, C. - Activation of histidini decarboxilase in tumor cells in mice. Nature, 194: 380-381, 1962.
- KLEIN, L. and Weiss, P.H. - Reutilization of mature collagen in vivo. Bioch. Bioph. Communicat., 21: 311-317, 1965.
- KWAAN, H.C. - A histochemical study of fibrinolytic activity and protease content of mast cells. Amer. J. Clin. Pathol., 41: 604, 1964.
- LaBELLA, F.S. - Relationship of tyrosini to native fluorescence of collagen and elastin. Effects of ultraviolet irradiation. Abstracts of papers presented at the 18th annual meeting of the Gerontological Society, Los Angeles, California, Apud Collag. Cur, 7: 113-1966.
- _____, F.S. and Paul, G. - Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. J. Geront., 20:54-59, 1965.
- LATIL, P. - O pensamento artificial - Tradução de "Introduction à la cybernetique. La Pensée artificielle"- 11ª edição. Ibrasa - 1959 - São Paulo
- LEBLANC, J., Hout, L. and Corrivault, W. - A possible role for histamine in larval growth. Experientia. 18: 1-6, 1962.
- LEVY, M. and Magoulas, J. - Internal hydrogen bonding of some dicarboxylic acid monoanions in urea solution. Abstr.

- 139th. - meeting ACS, 1961.
- MaCKAY, D., Reid, J.D. and Shepherd, D.M. - Histidine decarboxylase and growth. Nature, 191: 1311-1312, 1961.
- MATHEWS, M.B. - The interaction of collagen and mucopolysaccharides. Biochem. J., 96: 710-716, 1965.
- MAUDSLEY, D.V. and West, G.B. - The site of increased formation of histamine in the pregnant mouse. J.Physiol., 174:473-482, 1964.
- MEYER, K. - The mast cell; (in a discussion). in, "Polysaccharides in biology". Springer, G.F. The Josia Macy Jr. Foundation, 1959.
- MILCH, R.A. - Studies on the pathogenesis of collagen tissue changes in alcaptonuria. Surgical Forum, 11: 448-449 1960.
- _____ - Biochemical studies of osteoarthritis: Interaction of certain intermediary metabolites with collagen. Comunicazione al X Congresso della Lega Internazionale contro il Reumatismo. - Roma 3-7 settembre 1961, Estrato dal II Vol.
- _____ - Studies on alcaptonuria: Further observations on the interazioni of homogentisic acid solutions with collagen. Comunicazione al X Congresso della Lega Internazionale contro il Reumatismo - Roma, 3-7 settembre 1961.
- _____ Studies of collagen tissue aging: Interaction of certain intermediary metabolites with collagen. Gerontologia 7 : 129-152, 1963.
- MISSMAHL, H.P. - Quantitative evaluation of the effect of phenol on collagen fibers. Proc.Tel-Hashomer Hosp., 3: 39-40, 1964.
- MORGAN, R.E. - An effect of inflammation on human gingival collagen. J.Period., 36: 245-247, 1965.

- PARTRIDGE, S.M. - La nature chimique de l'elastine. in, Colloque sur la biochimie du tissu conjonctif. Boulanger, P., Jayle, M. F. et Roche, J. Masson Cie éditeur - Paris, 1963.
- PERLMUTTER, H.I. - In coronary heart diseases. Edited by Likff, W. and Moyer, J.H. - Library of Congress Catalog Card n° 62, 1944, p. 28 - New York - 1963.
- RILEY, J.F. - Histamine and heparin in mast cells: Why both? Lancet, 2: 40-41, 1962.
- ROBERT, L. et Robert, B. - Mécanismes enzymatiques de la dégradation du tissu conjonctif a l'état normal et pathologique. in Exposés Annuels de Biochimie Médicale-Direção de Boulanger, M. Jayle et Roche, J. - Colloque sur la biochemie du tissu conjonctif. Masson et Cie., Paris, 1963.
- ROCHA e Silva, M. - On the nature of the receptor for histamine. Chemotherapia., 3: 544-559, 1961.
- _____ - Anaphylotoxin and histamine release. Quart.Rev. Allerg.Appl.Immunol., 8: 220-238, 1954.
- _____ - Histamine - Triângulo, 3: 1-9, 1957.
- _____ - The participation of substances of low molecular weight in inflammation with special reference to histamine and bradykinin. in, Injury, inflammation and immunity. Copyright, Miles Laboratories, Inc., 1964. p. 220-241.
- ROMHANYI, G. - Uber die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. Acta Histochem., 15: 201-233, 1963.
- ROSS, K.F.A. - The imersion refratometry of living cells by phase contrast and interference microscopy. in "General citochemical methods" v.2, editor Danielli, J.F. Academic Press Inc., p. - 1-58, 1961.

- SCHMITT, F.O. - Macromolecular fabrics in biological systems, their structural and physiological significance. J.Cell.Comp.Physiol, 49: 85-104, 1957.
- _____ - Interaction properties of elongate protein macromolecules with particular reference to collagen (tropo-collagen). in, Biophysical science. A study program. Jhon Wiley & Sons, Inc. New York, 1959.
- SETHI, D.J. and Houck, J.C. - Dermal collagen response to injury. J.Invest.Derm., 37: 85-86, 1961.
- SHAW Jr., E.H. - Expansion of the collagen lattice by urea derivatives. Abst. 139th. Meeting Amer.Chem.Societ., 1961.
- _____ and Rost, M.C. - Collagen lattice expansion by 1,3 propanediols. Abst. 141th. Meeting Amer.Chem.Societ. 1962.
- _____ and Helgerson, K. - Comparison of oriented crystallization and swelling on collagen. Proc.S.D.Acad.Sci., 41: 145-149, 1962.
- _____ and Christensen, A.R. - Modification of the collagen lattice by aromatic dihydroxy compounds. Abstr. 145th. Meeting Amer.Chem.Soc., 1963.
- _____ - Oriented crystallization of amides on collagen with modifications of the collagen lattice. Advances in X ray analysis. 7 : 252-255, 1963 (Proceedings of the Twelfth Annual Congerence on Applications of x ray analysis, held-August 7-9-1963).
- _____ and Schulte, B. - The collagen lattice in 1,2 - propanediol and its expansion by hydrogen bonding material. Sixth International Congress of Biochemistry. July, 26, august 1-1964.
- _____ and Schulte, B. - Collagen lattice modification by amides. Abstr. 146th. Mettings Amer.Chem.Soc., jan.

19-24, 1964.

- SHAW, Jr. E.D. and Zarins, I. - Oriented crystallization of 1,6 haxanediol on collagen with expansion of the collagen lattice. Proc.S.D.Acad.Sci., 56: 176-178, 1965.
- SMITH, D.J. and Schuster, R.C. - Biochemistry of lathyrisim I. Collagen biosynthesis in normal and lathyrie chic embrios. Arch.Biochem.Biophys., 98: 498-501, 1962.
- SPECTOR, W.C. and Willoughby, D.A. - The inflammatory response. Bact.Rev., 27: 117-154, 1963.
- VIDAL, B.C. e Benatti, O. - Mecanismo biológico na formação das bolsas periodontais. R.Biol.Oral, 1: 24-34, 1963.
- _____ - Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. Protoplasma, 56: 529-536, 1963.
- _____ The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of the collagen. Protoplasma, 59:472-479, 1964.
- _____ Sôbre a organização dos mucopolissacarídeos ácidos em tendões calcaneares de cobaias (*Cavia Pocellus*). Tese de Livre-Docência. Os resultados desta tese foram apresentados no "Symposium International sur le Tissu Conjonctif". setembro de 1965. E também saíram publicados com o nome de "Macromolecular desorientation in detached tendons. Protoplasma, 62:121, 1966.
- _____ Distribuição de fibras colágenas em cimento humano. Rev.Biol.Oral, 2: 1-8, 1964.
- _____ Detecção histoquímica de mucopolissacarídeos ácidos em cimento humano. R.Biol.Oral, 2: 9-14, 1964.
- _____ Orientação macromolecular de mucopolissacarídeos ácidos em cimento humano. R.Biol.Oral, 2: 15-20, 1964.
- _____ - Variação da birrefringência dos feixes de colágeno. ReVBiol.Oral, 4: 1-11, 1966.

- VIDAL, B.C. - Fenômenos de regulação e controle na estrutura periodontal. Mecanoquímica. III Congresso Paulista de Odontologia. São Paulo, S.P. 17-23 junho 1966 e Rev.Biol.Oral, 4: 1966.
- _____ Histoquímica em Patologia (Biocibernética do tecido conjuntivo VI Congresso Brasileiro de Patologia - Salvador, Bahia, 5-9 de julho de 1966.
- VISZLOY, K. and Ksza, G. - Polarization optical study of osteogenesis imperfecta. Abstr. in Acta Morphol.Acad.Sci. Hung.Sppl. nº 13, 57: 1965, apud Col.Cur. 6: 646. 1966.
- VIZIOLI, M.R. and Vidal B.C. - Coriphosphin in the histochemistry of acid mucopolisaccharides. Trabalho apresentado no Seminário Anual da Cadeira de Patologia em ou tubo de 1966, enviado para publicação.
- VOROB'EV, V.J. - Conformational changes of macromolecules and mecanochemistry. Abhandl.Deut.Akd.Wiss. BerlinKl. Med. . nº 6: 13-19, 1964.
- WILLOUGHBY, D.A. and Spector, W.G. - Adrenaline precursors in the inflammatory reactions. J.Patho.Bact., 88: 159-166, 1964.

*



FIG. 1 — Corte histológico de tendão removido 3 horas após a injeção de histamina. No alto, partes do feixe ainda sem intumescimento, somente uma fragmentação. No centro, feixe de fibras com fragmentações, intumescimentos e formação de grumos. Observar também as transformações morfológicas dos fibroblastos. Coloração pelo azul de toluidina, solução aquosa 0,025%, pH 4. Aumento original $16 \times 1,25 \times 3,2$. Fotomicroscópio Zeiss.



FIG 2 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 1 hora e 30 minutos após injeção de histamina. Notar o aspecto morfológico dos fibroblastos que se apresentam pleomórficos, alguns condróides. Coloração pelo azul de toluidina. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original 40x1,25x6,3.



FIG. 3 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 30 minutos após aplicação de histamina. Exame em microscopia de fluorescência, coloração pela corifosfina, pH 4; técnica para mucopolissacarídeos ácidos. A figura mostra maior fluorescência nas zonas intumescidas e fragmentadas do feixe. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original 16x1,25x3,2.



FIG. 4 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 1 hora após aplicação de histamina. Microscopia de fluorescência, corifosfina, pH 4, técnica para mucopolissacarídeos ácidos. As zonas fragmentadas e intumescidas apresentam-se fluorescentes (esta fluorescência é maior que nos feixes não fragmentados). São também visíveis fibroblastos com fluorescência citoplasmática. Fotomicroscópio Zeiss aumento original 40x1,25x3,2.

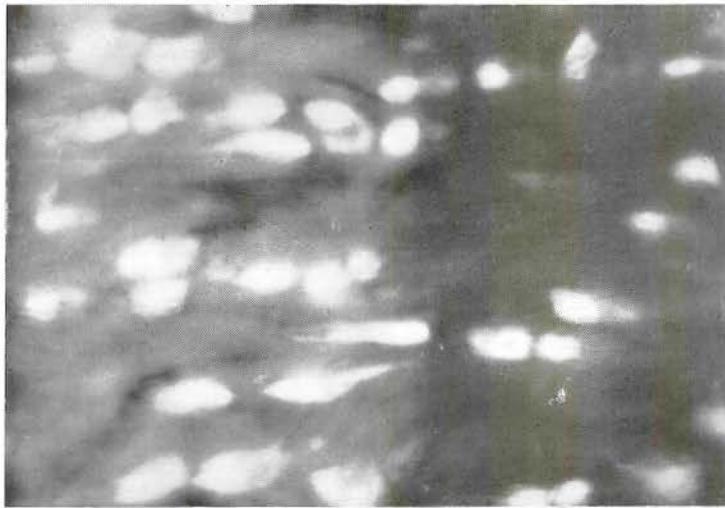


FIG. 5 — Fotomicrografia de material de mesma proveniência que a figura anterior. Microscopia de fluorescência, coloração com corifosfina, pH 2,5. Notar, a permanência de fluorescência nas partes intumescidas e fragmentadas do feixe, forma de fibroblastos e permanência de fluorescência citoplasmática. Fotomicroscópio Zeiss aumento original 40x1,25x3,2.

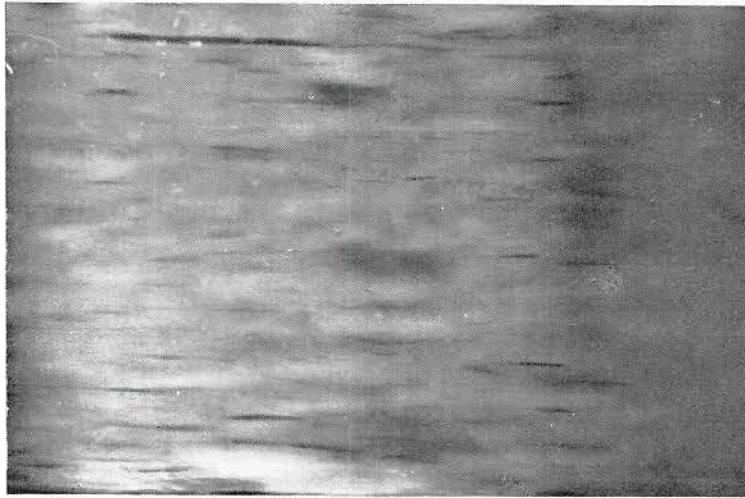


FIG 6 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão normal. Microscopia de fluorescência, fluorescência natural. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original: 16x1,25x3,2.



FIG. 7 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 30 minutos após injeção de histamina. Fluorescência natural. Notar aumento geral, ligeiro, da fluorescência natural; aumento nítido da fluorescência natural das zonas fragmentadas e intumescidas. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original 16x1,25x3,2.

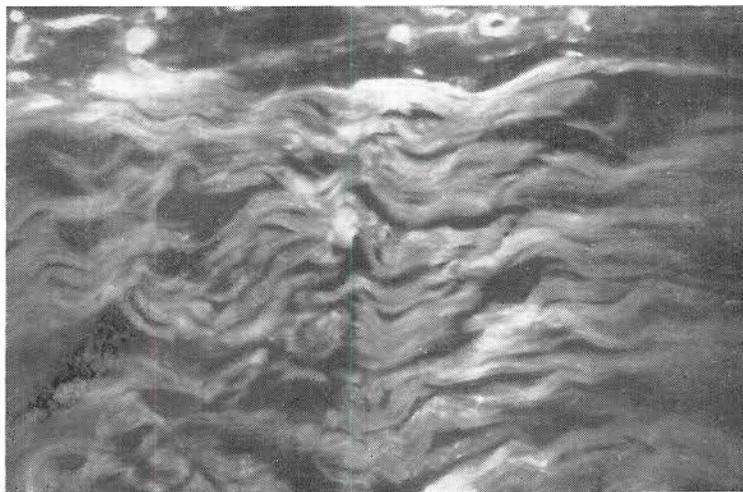


FIG. 8 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 1 hora e 30 minutos após a aplicação de histamina. Mesmas características técnicas e histológicas da fotografia anterior.

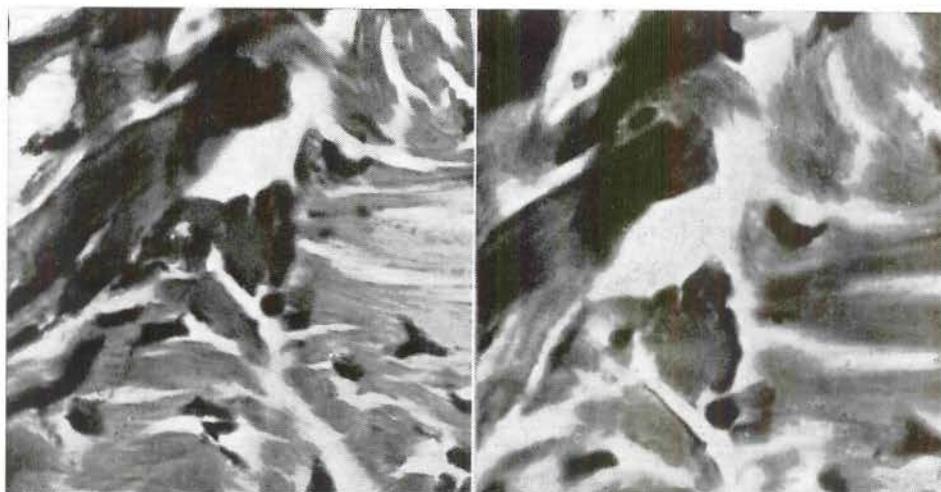


FIG. 9 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 2 horas após a aplicação de histamina. Corte preparado para a observação de dicroísmo, como já referido. Comparar a imagem da esquerda, feixe paralelo ao azimute de polarização, com a da direita, feixe perpendicular ao azimute. Observar o desaparecimento do dicroísmo nas regiões fragmentadas e intumescidas. Fotomicroscópio Zeiss, amento original 40x2x3,2.

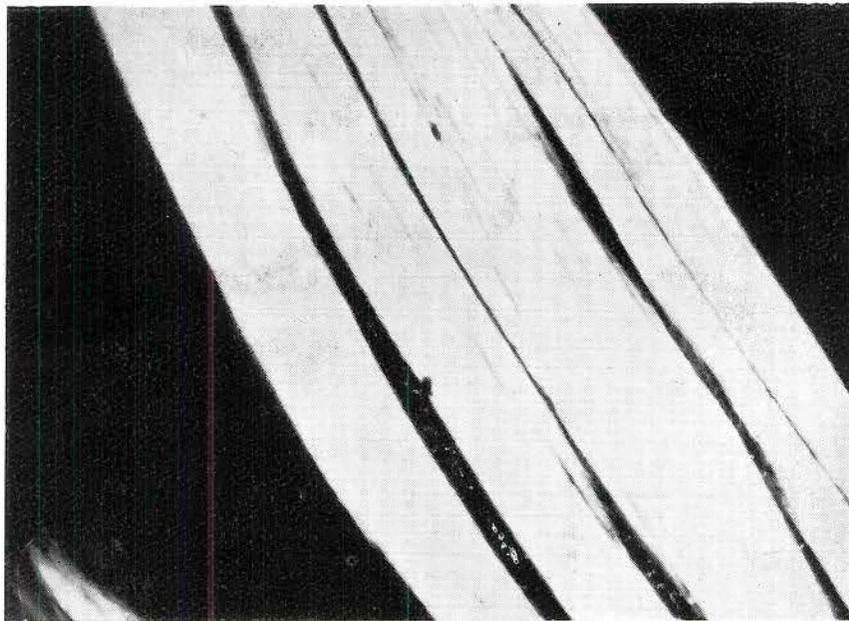


FIG. 10 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão normal. Microscopia de polarização, imagem de birrefringência dos feixes de colágeno. Observar o aspecto da birrefringência e comparar com as figuras de birrefringência dos tendões injetados. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original 16x2x6,3.

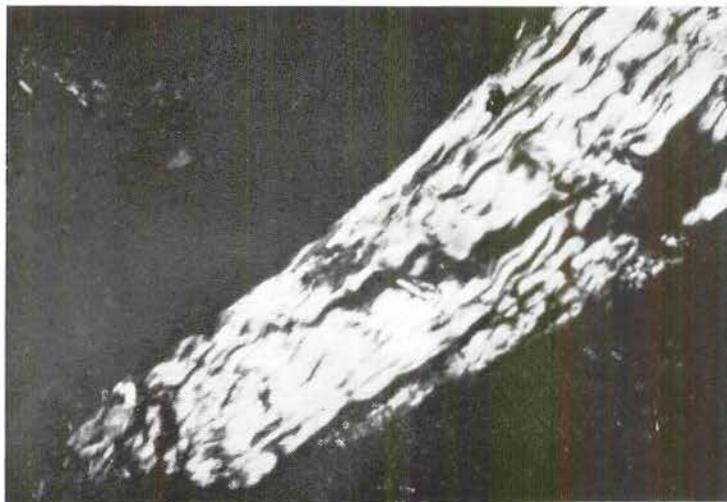


FIG. 11 — Fotomicrografia de tendão removido 30 minutos após a injeção de histamina. Microscopia de polarização. A imagem da birrefringência é descontínua. As zonas de fragmentação mostram-se com menor birrefringência que as zonas não fragmentadas. Compare esta figura com a anterior. Fotomicroscópio Zeiss, aumento original 6,3x2x3,2.



FIG. 12 — Fotomicrografia de tendão após injeção de histamina. Mesmas características técnicas e mesmos objetivos que a figura anterior. Apenas mostra outro corte e outra zona histológica; comparar com as figuras anteriores, acompanhando o texto.

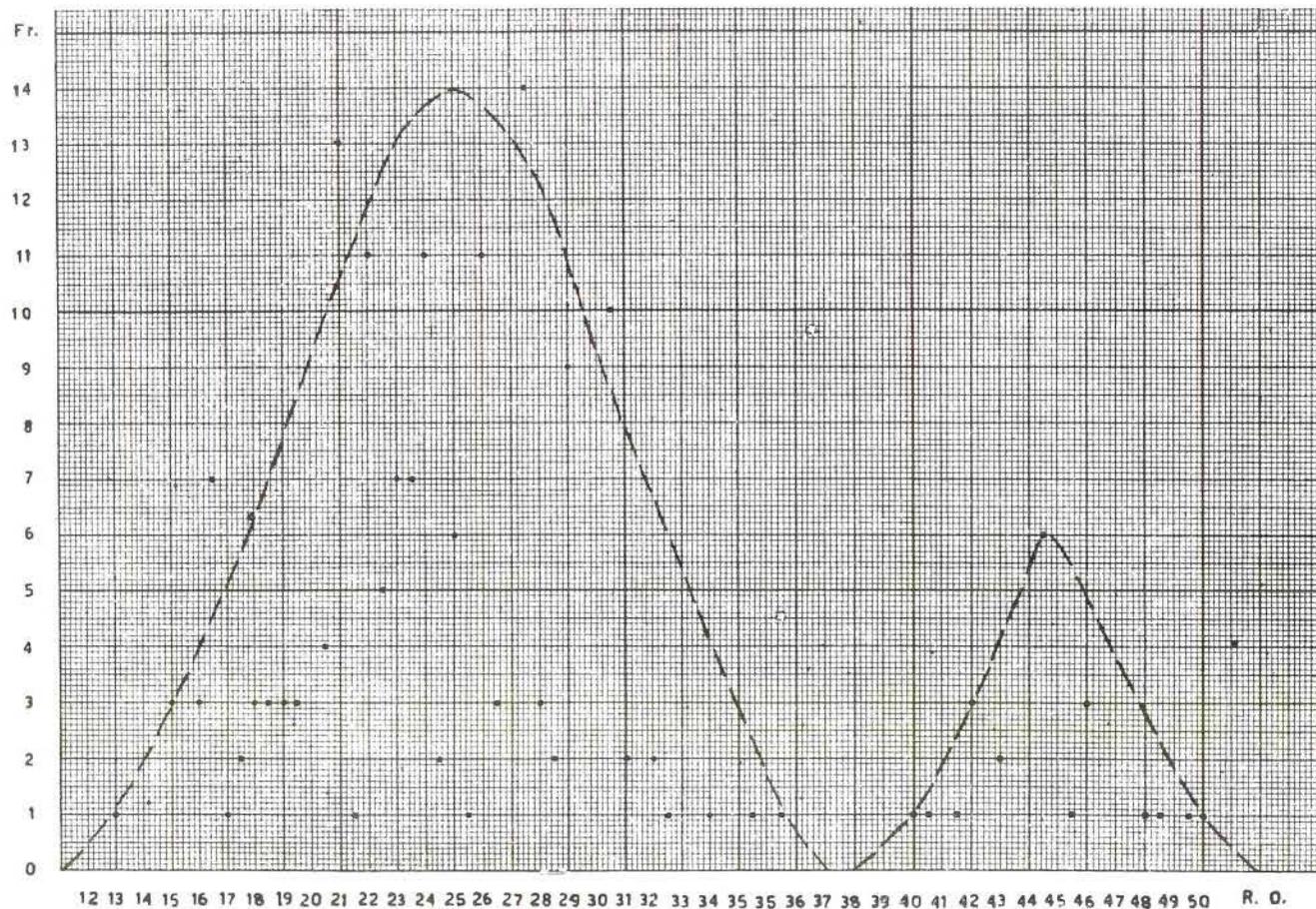


FIG. 13 — Gráfico da distribuição das medidas de retardos ópticos das birrefringências. A curva da direita foi elaborada com as medidas levantadas de cortes de tendão normal; a da esquerda com os dados dos tendões injetados. Na linha das abscissas estão expressos, em milimicrons, os retardos ópticos, na linha das ordenadas estão estipuladas as frequências representando cada algarismo o número de vêzes em que uma medida, um retardo óptico, apareceu.

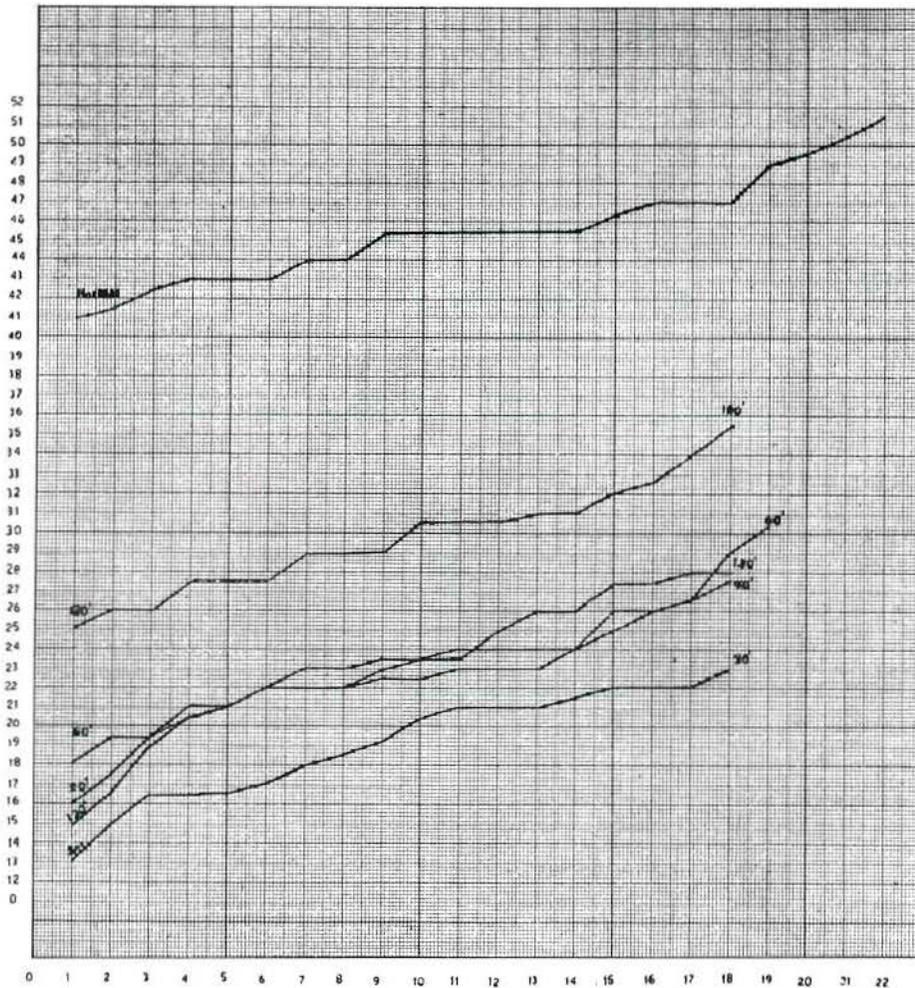


FIG. 14 — Gráfico de medidas dos retardos ópticos das birrefringências de tendões injetados e de tendões normais. O objetivo d'êste gráfico é mostrar a relação entre os retardos ópticos dos tendões normais e dos tendões injetados, removidos com intervalos de tempo diferentes. Na abscissa estão marcadas, de 0 a 22, tôdas as medidas. Os valores das birrefringências, em milimicrons, estão colocados na ordenada, de 0 a 52. De baixo para cima, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos e 180 minutos, por último medidas dos tendões normais. Notar que os valores dos retardos ópticos vão aumentando a medida que há demora em se remover o tendão.

2178



FIG. 15 — Fotomicrografia de corte histológico de tendão removido 60 minutos após a injeção de histamina. Imagem observada no microscópio de interferência. A franja central de interferência foi alargada. O campo torna-se integralmente escuro e o objeto apresenta um brilho proporcional à diferença de fase entre a frente de onda que o atravessa e a que atravessa o meio em que está. A compensação será obtida pela rotação do analisador até que haja uma inversão do brilho, veja figura seguinte. Fotomicroscópio Zeiss Pol. Interferencial, aumento original 10x1,25x3,2.

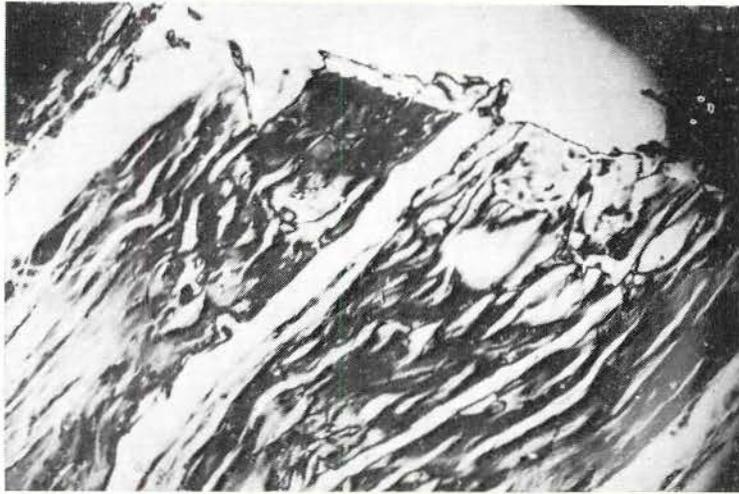


FIG. 16 — Mesmo corte histológico e mesma zona que a Fig. 15, anterior, esta foto foi tirada imediatamente após a compensação, nesta o objeto torna-se tão escuro quanto o campo que o envolvia anteriormente e este tão claro quanto o objeto era antes da compensação. Mesmas características técnicas da figura anterior n. 15.