

MÁRIO ROBERTO VIZIOLI

Relação entre Fosfomonoesterases e a Síntese de Colágeno e Mucopolissacarídeos Ácidos no Tecido de Granulação

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para o Concurso de Habilitação à
Docência Livre na Disciplina de Patologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

T 250

PIRACICABA
1975

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ZEFERINO VAZ, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio nunca negado à nossa Faculdade.

Aos Profs. Drs. JOSÉ MERZEL e ANTONIO CARLOS NEDER, Diretor e Diretor Associado desta Faculdade, pela compreensão e estímulo que dedicam aos docentes desta Casa.

Ao Prof. LOURENÇO BOZZO, Chefe da Disciplina de Patologia, pelo incentivo e espírito de solidariedade com que sempre me distinguiu.

Ao Prof. Dr. GUILHERME BLUMEN, pela colaboração de sinteressada com que me orientou nas técnicas radioautográficas.

À Profa. Dra. SÔNIA VIEIRA, pelo atendimento pronto e gentil, e pela segura orientação no tratamento estatístico deste trabalho.

Ao Prof. Dr. MOUSTAPHA MOHAMMED EL-GUINDY, pelas valiosas sugestões, que muito me auxiliaram na elaboração desta pesquisa.

Aos técnicos de laboratório ANTONIO KERCHES DE CAMPOS E ADILSON PINTO PEREIRA, e ao Sr. JOSÉ CARLOS DE CAMPOS, pela colaboração das partes técnica e fotográfica.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram na elaboração deste trabalho.

*

*

*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISTA DA LITERATURA	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 - Seleção dos animais	15
3.2 - Implantação das esponjas	15
3.3 - Sacrifício dos animais	15
3.4 - Coloração com hematoxilina-eosina	16
3.5 - Técnica radioautográfica	16
3.6 - Técnica histofotométrica	17
3.7 - Histoquímica das fosfomonoesterases	18
4. RESULTADOS	19
4.1 - Coloração com hematoxilina-eosina	19
4.2 - Técnica radioautográfica	21
4.3 - Técnica histofotométrica	24
4.4 - Histoquímica das fosfomonoesterases	28
5. DISCUSSÃO	33
5.1 - Coloração com hematoxilina-eosina	33
5.2 - Técnica radioautográfica	34
5.3 - Técnica histofotométrica	35
5.4 - Histoquímica das fosfomonoesterases	38
6. CONCLUSÕES	48
7. RESUMO	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
9. APÊNDICE	62

I - INTRODUÇÃO

O tecido de granulação induzido artificialmente em animais de laboratório através de diferentes agentes tem sido usado com bons resultados na pesquisa dos mais diversos aspectos da gênese e evolução dos processos de reparação do organismo animal.

Um dos pontos que têm sido mais abordados recentemente é a pesquisa da presença de enzimas durante a evolução do tecido de granulação. Entretanto, forçoso é reconhecer que, embora a detecção histoquímica da presença de enzimas na gênese do tecido conjuntivo possa ser realizada, a questão se torna mais problemática quando se trata de interpretar os resultados obtidos dessa e mesmo de outras técnicas mais sofisticadas. Isso porque, apesar de todo o progresso da Biologia, não se sabe ainda se determinados tipos de enzimas tomam parte ou não no pro-cesso (as opiniões são contraditórias) e, acima de tudo, qual a verdadeira ação desses enzimas no caso em questão (não se tem ainda nenhuma idéia bem definida).

À guisa de esclarecimento, eis algumas opiniões de conceituados autores sobre o papel de um determinado enzima, a fosfomonoesterase conhecida por fosfatase alcalina, na gênese das fibras de colágeno:

"Não há ainda nenhuma explicação satisfatória acerca do papel da fosfatase no processo de reparação do tecido conjuntivo" (Mc MINN, 1969).

"O papel exato da fosfatase alcalina no metabolismo do tecido conjuntivo é muito difícil de ser determinado" (MOSS, 1970).

Ressalte-se ainda o fato de que a fosfatase alcali-

na é a fosfomonoesterase mais pesquisada no tocante à gênese do tecido conjuntivo e dos processos de fibrogênese. Se pouco é conhecido sobre ela neste campo, é óbvio que menos ainda é sabido sobre a presença e atuação das demais fosfomonoesterases.

Entretanto, existem algumas hipóteses sobre o problema. Uma das mais divulgadas sugere que a fosfatase alcalina estaria diretamente ligada à gênese das fibras de colágeno, sendo mesmo indispensável para o perfeito desenvolvimento deste fenômeno biológico.

Por outro lado, há autores que negam inclusive a presença das fosfomonoesterases no tecido de granulação, embora a grande maioria confirme este fato.

Evidentemente, partindo-se do pressuposto de que as fosfomonoesterases atuem diretamente sobre a gênese tecidual, algumas outras teorias podem ser formuladas, tais como o fato que durante a síntese de colágeno, e a sua posterior agregação sob a forma de feixes, as fosfomonoesterases (ou, pelo menos, algumas delas) deveriam estar presentes no tecido, podendo a sua presença diminuir ou mesmo desaparecer por completo, uma vez terminada a maturação do tecido. Existem na literatura vários trabalhos - que realmente sugerem fortemente este fato, no que tange à fosfatase alcalina. Quanto às demais fosfomonoesterases, muito pouco se conhece até o momento.

Indispensável à formação da substância intercelular do tecido conjuntivo é a síntese de mucopolissacarídeos ácidos - (glicosaminoglycans). Como um dos primeiros fenômenos nos processos de gênese e reparação é a proliferação fibroblástica, é importante que se recorde que os fibroblastos são os responsáveis não apenas pela síntese de colágeno, mas também dos mucopolissacarídeos ácidos, que permitem a agregação do colágeno em feixes.

Dessa maneira, a pesquisa dos mucopolissacarídeos ácidos deve acompanhar a pesquisa sobre a fibrogênese.

Assim, investigando-se a presença das fosfomonoesterases no tecido conjuntivo em evolução, os resultados poderão afirmar se, de fato, esses enzimas participam do processo, conseguindo-se, dessa maneira, um quadro bastante sugestivo do comportamento enzimático na gênese do tecido conjuntivo.

Sendo comprovadas estas assertivas, poder-se-á afirmar que, realmente, as fosfomonoesterases participam, direta ou indiretamente, da formação do tecido de granulação. Isso será bastante útil para o aperfeiçoamento dos conhecimentos sobre os processos de reparo e cura de feridas, assunto de vital importância no campo biológico.

Resumindo, propõe-se neste trabalho:

a) acompanhar a gênese e a proliferação de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação, desde sua formação até sua maturação.

b) levar a efeito, nesse tecido, a pesquisa histoquímica da presença das fosfomonoesterases nos diversos estágios evolutivos do tecido.

c) confrontar os resultados obtidos nos itens a e b. Com base nesse confronto, procurar estabelecer as correlações existentes entre a síntese e a proliferação de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos e a presença e atividade das fosfomonoesterases no tecido de granulação.

II - REVISTA DA LITERATURA

A síntese de colágeno e seu posterior desenvolvimento foram bastante estudados em tecidos de granulação, tanto aqueles obtidos por meio de implantação de corpos estranhos, como - por meio de injúrias produzidas com a finalidade de se obter subsídios para a melhor compreensão dos mecanismos de cura.

Um dos primeiros aspectos a serem estudados, e que interessa bastante a esta pesquisa, foi aquele relativo ao tempo durante o qual a síntese de colágeno inicia-se e evolui. De acordo com STEIN & WOLMAN (1958), a síntese das fibras no processo de cura começa por volta do 4º dia pós-injúria, completando-se - no 8º dia. GOULD (1958), trabalhando com material obtido por implante de esponja de policlorovinil (PVC), afirmou que a formação de fibras começa entre o 5º e o 7º dia de desenvolvimento do tecido, achado esse semelhante ao obtido por JOHNSON & Mc MINN (1958), que ressaltaram ainda que a fibroplasia é mais intensa - durante as 2a. e 3a. semanas de desenvolvimento.

Essa opinião, com pequenas variações decorrentes de técnicas de trabalho, foi confirmada pela grande maioria dos estudos posteriores realizados nesse campo (JACKSON & BENTLEY, 1960; ROSS & BENDITT, 1961; SANDBERG, 1963; KULONEN, 1965; SELYE et alii, 1969; VIZIOLI, 1971 e 1973; FEHER, JENNINGS & RANNIE, 1971; VIZIOLI, VALDRIGHI & BOZZO, 1972).

Por meio de estudos bioquímicos, NOBLE et alii (1958) asseguraram que a síntese de colágeno se torna bastante evidente a partir do 9º dia de evolução do tecido de granulação provocado por implantação de esponja, ao passo que JACKSON, FLICKINGER & DUNPHY (1960) afirmaram que o aumento de conteúdo em colágeno do tecido pode ser notado desde o 3º dia de desenvolvimento, ressal

tando porém que, a esse tempo, as fibras de colágeno não são ainda detectáveis por métodos histológicos.

O método mais indicado para a pesquisa da síntese de colágeno é, sem dúvida, a radioautografia. A localização intracelular da biosíntese do colágeno foi estudada com o auxílio da prolina marcada por LOWTHER, GREEN & CHAPMAN (1961) e PROCKOP, PETERKOFKY & UDENFRIEND (1962), enquanto HAUSMANN & NEUMANN (1961) estudaram a atividade específica da prolina na biosíntese do colágeno por meio de isótopos radioativos. Estudos realizados por ROSS & BENDITT (1965) com prolina marcada indicaram que os passos iniciais na formação do colágeno estão associados com os ribossomos do retículo endoplasmático. Estudando a síntese e a secreção de colágeno pelos fibroblastos no processo de cura de feridas, ROSS (1965) mostrou que, a partir de 15 minutos após a injúria, os fibroblastos iniciam a síntese, que se estende até 7 dias depois, último tempo estudado.

Da análise desses e de outros trabalhos citados a seguir, pode-se depreender que, em tecidos de granulação, a síntese de colágeno é detectável a partir de 4 a 7 dias de desenvolvimento, dependendo do tipo de material empregado na produção do granuloma. A partir desse tempo, a atividade fibroblástica aumenta progressivamente, atingindo o máximo entre 15 a 21 dias de desenvolvimento. Após 3 semanas de evolução, o tecido de granulação está organizado, e o colágeno está agregado sob a forma de feixes, conforme demonstrado por VIZIOLI (1971), através de estudos por meio de dicroísmo. É evidente que as características físicas do colágeno, como por exemplo, a sua resistência aos esforços de tensão, demoram um pouco mais para serem alcançadas, variando dentro de um espaço de tempo que vai de 30 dias (SANDBERG,

1963) até 60 dias (DOUGLAS, FORRESTER & OGILVIE, 1969).

Quanto à síntese de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação, os estudos histoquímicos apontam que a proliferação desses componentes é bastante rápida durante as primeiras duas ou três semanas, segundo os resultados obtidos por FROMM (1958) e SCHILLING, JOEL & SHURLEY (1959).

UHER (1965) afirmou que, na reparação de feridas, os mucopolissacarídeos ácidos podem ser encontrados nas primeiras 24 horas, mas são provavelmente de origem hematogênica. A síntese começa realmente a partir do 2º ao 4º dias, estendendo-se por mais 2 semanas. Este autor acentuou ainda a estreita relação entre os mucopolissacarídeos ácidos e a produção de fibras, tendo como consequência a proliferação tecidual. Estes achados são semelhantes àqueles obtidos por CAMPANI & REGGIANINI (1950) e CHVAPIL (1967).

Quanto ao tipo de mucopolissacarídeos ácidos presentes no tecido de granulação, o ácido condroitin sulfúrico tipo A (condroitin-4-sulfato) aparece mais cedo que o tipo B (dermatan-sulfato), sendo que este substitui aquele (BOLLET, ANDERSON & SIMPSON, 1958). Na primeira semana de inflamação, o aumento de ácido hialurônico é duas vezes maior que a formação de mucopolissacarídeos sulfatados; ao redor do 10º dia, a quantidade de ácido hialurônico decresce, representando a partir daí apenas 25% do total de mucopolissacarídeos ácidos presentes (DELAUNAY & BAZIN, 1964).

Embora sem se preocupar em comparar quantidades de substância fundamental, VINOGRADOV (1967) confirmou o acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação desde os primeiros dias, afirmando também que, com o aumento da produção de

colágeno, a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos decresce, e a metacromasia acumula-se nas fibras. Relatou também que o desenvolvimento da fibrogênese causa primeiramente um aumento da metacromasia, a qual decresce na fase posterior da evolução do tecido.

FEHER et alii (1971) confirmaram o aparecimento de mucopolissacarídeos na inflamação experimental logo no início do processo, e afirmaram que a máxima intensidade da reação histoquímica para essas substancias foi conseguida ao 3º dia.

Estudando a integração colágeno-mucopolissacarídeos ácidos através do dicroísmo, VIZIOLI (1971) encontrou metacromasia no tecido de granulação a partir do 4º dia de proliferação, sendo que o ponto mais alto da reação metacromática foi obtido após 15 dias de desenvolvimento, caindo depois do 21º dia.

Os estudos bioquímicos nesse sentido, ao que parece, não são concordantes entre si. Assim, JACKSON et alii (1960) afirmaram que existe pouco condroitin sulfato no tecido de granulação, e sugeriram que uma grande concentração de mucopolissacarídeos ácidos não é essencial à formação de colágeno durante a cura. Inversamente, BENTLEY (1967) e GOLDIN & JOSEPH (1968) encontraram crescentes quantidades de condroitin-sulfato a partir de 4 a 5 dias de inflamação; concluíram também que as altas quantidades de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação permanecem além dos primeiros dias de reparação do tecido.

Desta maneira, com algumas exceções, a opinião geral entre os autores é que a síntese de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação é detectável histoquimicamente a partir do 3º ou 4º dia de proliferação, sendo que a quantidade dessas substancias permanece mais ou menos constante durante duas sema-

nas, decaindo posteriormente, provavelmente em função do organização e maturação do tecido.

Pesquisas radioautográficas nesse sentido, usando - se S^{35} como precursor da síntese de mucopolissacarídeos ácidos confirmaram em grande parte as suposições acima citadas. Foi demonstrado por KODICEK & LOEWI (1955) e SLACK (1957) que a atividade proliferativa começou ao 5º dia e cresceu até ao 18º dia, decaindo posteriormente, até que, por volta do 21º dia, foi regressando aos valores originais. Usando as mesmas técnicas, HAUSS & HULSING (1961 a, b) e NISAKA (1964) encontraram também aumento nas quantidades de condroitin-sulfato nos tecidos de granulação provocados por injeções de "croton oil".

Associado à pesquisa da fibrogênese e da formação de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação, o estudo histoquímico da presença de enzimas nesse campo foi iniciado por GOMORI (1941), que realizou uma pesquisa sobre a fosfatase ácida e sua distribuição em diversos tecidos, sob condições normais e patológicas. No tecido de granulação, ele demonstrou que os macrófagos exibiam grande quantidade de fosfatase ácida.

No entanto, conforme já citado, as pesquisas sobre enzimas no tecido de granulação foram orientadas, em sua quase - totalidade, para a fosfatase alcalina.

FELL & DANIELLI (1943) foram os primeiros autores a investigar a possível correlação entre a fibrogênese e a fosfatase alcalina. Estes autores observaram que a atividade enzimática crescia consideravelmente durante a cura de feridas, e a máxima atividade da fosfatase alcalina coincidia com o período de formação de novas fibras. A estas mesmas conclusões chegaram - posteriormente GOLD & GOULD (1951).

A pesquisa sobre a fosfatase alcalina e suas relações com a fibrogênese prosseguiu com os estudos realizados por JOHNSON & Mc MINN (1958), que, trabalhando com gatos e ratos, chegaram a uma imprevista constatação: a fibrogênese nos tecidos do rato confirmava plenamente a presença da fosfatase alcalina, mas no gato não havia nenhuma atividade enzimática, em período algum da fibrogênese. Assim sendo, estes autores terminaram por sugerir que a fosfatase alcalina talvez não fosse essencial à fibrogênese nos tecidos do gato.

Trabalhando com cobaias escorbúticas, GOULD (1960) concluiu que a queda da fibrogênese nesses animais coincidia com a diminuição da atividade da fosfatase alcalina.

Pesquisando as fases precoces da cura de feridas, RAEKALLIO (1960) encontrou forte atividade de fosfatases ácida e alcalina nos tecidos injuriados, concluindo que, possivelmente, estas fosfomonoesterases, juntamente com a leucina-aminopeptidase, representavam um dos passos mais iniciais no processo de cura.

RAEKALLIO & LEVONEN (1963 a, b), estudando processos inflamatórios de cobaias e ratos, comunicaram que existia atividade enzimática aumentada durante as fases de exsudação e proliferação, constando da presença de fosfatases ácida e alcalina, e de outra fosfomonoesterase, a adenosin-trifosfatase (ATP-ase), esta com atividade presente já 60 minutos após a injúria. Logo em seguida, RAEKALLIO et alii (1964) encontraram resposta enzimática diminuída em feridas de pele de rato cujos nervos foram excisados, quando comparada com a resposta enzimática em feridas de pele normal.

Mais recentemente, investigações sobre processos re

parativos de ratos e cobaias realizadas em alvéolos dentais (OJA LA, 1968; TODO, 1968) e em tecido ósseo (RAEKALLIO & MAKINEN , - 1969) confirmaram a presença de fosfatase alcalina em estreita - relação com a evolução do tecido de granulação.

Estudando o desenvolvimento do tecido de granulação produzido por implantação de esponjas de PVC em ratos, VIZIOLI - et alii (1972) concluíram que a atividade da fosfatase alcalina é diretamente proporcional ao aumento da fibrogênese, sendo que ambos os processos atingem o máximo de atividade por volta de 15 a 20 dias, o que também é verdadeiro para a produção de mucopo - lissacarídeos ácidos.

A propósito desta última afirmação, é conveniente - citar-se que a relação entre a síntese de mucopolissacarídeos ácidos e o aumento de atividade da fosfatase alcalina foi proposta por KROON (1952) e MOOG & WENGER (1952).

Apesar desta grande quantidade de trabalhos sugerindo um papel de algumas fosfatases no processo de reparo, outros autores (MARCHANT, 1949; ROBERTSON, DUNIHUE & NOVIKOFF, 1950) - não encontraram relação alguma entre a fosfatase alcalina e o desenvolvimento da cura de feridas. WOESSNER & BOUCEK (1961) chegaram mesmo a afirmar que as fosfatases ácida e alcalina não tem nenhuma relação com o processo de síntese de colágeno.

Não foram encontradas na literatura quaisquer referências a trabalhos realizados em processos de reparo, relacio-nando este mecanismo biológico com a atividade das duas fosfomo-noesterases não citadas nesta revisão, ou sejam, a 5'-nucleotidase e a glucose-6-fosfatase.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados para esta pesquisa 112 ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), adultos jovens (120 dias), machos, pesando entre 160 e 180g. Os ratos foram escolhidos no momento do nascimento, evitando-se aqueles nascidos de primeira cria. Após desmamados, os animais foram alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum". Atingida a idade desejada, os ratos foram submetidos aos procedimentos de implantação.

3.2 - IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

Fragmentos de esponjas de policlorovinil (PVC) medindo 0,8 x 0,8 x 0,8cm, esterilizadas em autoclave, foram implantados subcutaneamente nos animais, da seguinte maneira:

Após anestesia com etil-(1 metil-butil)-barbiturato sódico (Nembutal, Abbott), depilou-se a região dorsal mediana - traseira dos animais, e praticou-se uma incisão de aproximadamente 1,5cm, paralelamente ao longo eixo da coluna vertebral. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, procedeu-se à divulsão do tecido, para facilitar a introdução da esponja. A esponja foi introduzida com uma pinça apropriada, tão longe quanto possível da incisão, a fim de evitar que o processo de cicatrização da incisão atingisse o tecido de granulação em desenvolvimento. Uma vez implantada a esponja, a incisão foi suturada com 2 pontos separados. Todos esses procedimentos foram conduzidos sob rigorosas condições de assepsia.

3.3 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram sacrificados com golpe occi-

pital aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a implantação da esponja, para todos os métodos empregados nesta pesquisa.

3.4 - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Um lote de 16 ratos (8 para reserva), sendo 2 para cada dia de sacrifício forneceram material para os estudos de morfologia do tecido de granulação.

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

3.5 - TÉCNICA RADIOAUTOGRÁFICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE COLÁGENO

Do lote total de 112 ratos, foram separados 16 animais (8 para reserva), sendo 2 para cada dia de sacrifício. 10 minutos antes do sacrifício, os animais foram injetados intraperitonealmente com uma dose de 2,5 uCi de prolina-³H (Radiochemical-Amersham/Searle Corporation, U.S.A., atividade específica igual a 500 mCi/mmol) por kg de peso.

Sacrificados os animais, retirou-se o tecido de granulação do dorso de cada rato, sendo as peças lavadas rapidamente em solução fisiológica, depois do que procedeu-se à fixação dos blocos de tecido por meio da solução de Bouin, durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina, segundo a técnica rotineira. Obteve-se cortes de 7 micra de espessura, que foram montados em lâminas gelatinadas e corados pela hematoxilina-eosina.

As lamínas foram então radioautografadas pela técnica do "dipping film" (KOPRIWA & LEBLOND, 1962). Após exposição durante 30 dias, procedeu-se à revelação e fixação.

Empregou-se, para as observações microscópicas, o fotomicroscópio "ZEISS-POL II", no qual foram também obtidas as fotomicrografias.

3.6 - TÉCNICA HISTOFOTOMÉTRICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

Um lote de 48 ratos foi sacrificado da mesma maneira descrita anteriormente, nos mesmos dias pós-implantação, sendo 6 animais para cada dia de sacrifício. Os tecidos de granulação assim obtidos foram lavados rapidamente em solução fisiológica e colocados no fixador segundo LILLIE (1954), específico para mucopolissacarídeos ácidos, durante 24 horas, à temperatura ambiente. As peças foram a seguir incluídas em parafina, segundo a técnica de rotina, e cortadas na espessura de 7 micra.

Para a evidenciação histoquímica dos mucopolissacarídeos ácidos, foi empregada a técnica metacromática do azul de toluidina, pH 4, segundo indicado por LISON (1960).

Uma vez prontas, as lamínas foram montadas em meio sintético e depois levadas ao histofotometro (MICROSCOPE-PHOTOMETER ZEISS 01), utilizando-se a objetiva de 40 aumentos e luz monocromática na faixa de 540 mμ, como indicado por PEARSE (1968). Todos os pontos do tecido foram colocados sob medida, realizando-se um total de 20 medidas para cada lamina examinada, 3 lamínas para cada dia de evolução do tecido de granulação, cada lamina - de um animal diferente.

3.7 - HISTOQUIMICA DAS FOSFOMONOESTERASES

As fosfomonoesterases foram pesquisadas histoquimicamente em tecidos de granulação provenientes de um lote de 32 ratos, assim distribuídos: 8 animais forneceram tecido de granulação para a histoquímica enzimática; 8 para controle das reações e 16 para reserva. Os dias de sacrifício foram os mesmos já relatados anteriormente.

O material obtido deste lote foi colocado, imediatamente após sua retirada, no criostato ("CRYO-CUT", AMERICAN OPTICAL COMPANY), à temperatura de -30°C . Os cortes para as diversas técnicas enzimáticas foram obtidos diretamente das peças congeladas, na espessura de 10 micra.

Foram pesquisadas as seguintes fosfomonoesterases:

- a) Fosfatase alcalina (DANIELLI, 1958).
- b) Fosfatase ácida (TAKEUCHI & TANQUE, segundo PEARSE (1968).
- c) Adenosin-trifosfatase (ATPase), segundo WACHSTEIN & MEISEL, como indicado por PEARSE (1968).
- d) 5'-nucleotidase (WACHSTEIN & MEISEL, segundo PEARSE, 1968).
- e) Glucose-6-fosfatase (WACHSTEIN & MEISEL, segundo PEARSE, 1968).

Todas as reações enzimáticas foram levadas a efeito acompanhadas pelos cortes-testemunha, onde o substrato enzimático foi substituído por água destilada.

4 - RESULTADOS

4.1 - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

A primeira reação provocada pela esponja é uma reação inflamatória de corpo estranho, o que provoca a formação de uma cápsula fibrosa envolvente, que circunscreve completamente a esponja de PVC. É a partir dessa cápsula fibrosa que os elementos celulares migram para o interior da esponja, através de seus poros, e começam a proliferar. A sequência da proliferação do tecido de granulação, nos dias de desenvolvimento observados, foi a seguinte:

5 dias -: da cápsula fibrosa envolvente, já perfeitamente delineada, o tecido de granulação ainda incipiente começou a proliferar através da migração de um grande número de fibroblastos, que mostraram grandes núcleos arredondados e citoplasma irregular. Foi notada a presença de grande número de células mesenquimais dando origem a angioblastos. Capilares neoformados foram observados em grande número, sem evidências de circulação sanguínea. Uma vista geral do tecido de granulação de 5 dias pode ser observada na fig. 1.

10 dias -: a proliferação do tecido atingiu toda a periferia da cápsula fibrosa envolvente, caminhando para o centro da esponja. A celularidade do tecido mostrou-se bastante grande, com fibroblastos e angioblastos em franca proliferação. Muitos capilares neo-formados apresentaram circulação sanguínea. Notou-se também a formação ainda incipiente de feixes de fibras colágenas. O aspecto geral do tecido de 10 dias pode ser visto na figura 2.

15 dias -: o fibrosamento do tecido é maior, mas a

população fibroblástica continua grande. O tecido de granulação ocupou todos os espaços da esponja, que, a esta altura, começou a ser comprimida. Os vasos capilares estão já completamente formados. Notou-se também grande numero de macrófagos no tecido, - principalmente na periferia. A evolução do tecido de granulação de 15 dias pode ser avaliada na fig. 3.

20 dias -: o fibrosamento do tecido continuou aumentando, diminuindo os espaços dos poros da esponja. Vasos mais calibrosos, em pleno funcionamento, foram evidentes. A celularidade do tecido de granulação começou a diminuir muito levemente, constando principalmente de fibroblastos e macrófagos. Observe-se estes aspectos na fig. 4.

25 e 30 dias -: o tecido de granulação já completamente formado, começou a apresentar grandes feixes de fibras colágenas, tomando todos os espaços da esponja. A celularidade diminuiu bruscamente, sendo que os fibroblastos remanescentes apresentaram-se alongados. A vista geral do tecido nestes estágios de evolução pode ser vista nas figs. 5 e 6.

35 e 40 dias -: o tecido de granulação apresentou - alto grau de fibrosamento, sendo que os espaços deixados pela esponja ficaram reduzidos ao mínimo. Compactos feixes de colágeno predominaram no interior do tecido, conforme observado através - das figs. 7 e 8.

4.2 - TÉCNICA RADIOAUTOGRÁFICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE COLÁGENO

As lamínas radioautografadas mostraram a presença do material radioativo precursor nos fibroblastos do tecido de granulação em desenvolvimento, de tal maneira que os resultados não deixaram dúvidas sobre o fato que a prolina marcada foi incorporada pelos fibroblastos de acordo com um ritmo crescente, atingindo o máximo e decaindo posteriormente.

Desde os 5 dias de evolução, o tecido de granulação ainda incipiente mostrou evidente atividade dos fibroblastos em processo de síntese, conforme pode ser observado na fig. 9. Aos 10 dias, com o aumento do número de células ativas do tecido, a atividade de síntese aumentou (fig. 10), atingindo um máximo entre 15 e 20 dias de evolução (figs. 11, 12, 17 e 18).

A partir dos 25 dias, a atividade de síntese dos fibroblastos decaiu, em conformidade também com a queda da população celular do tecido (fig. 13), sendo que essa queda foi progressiva para os demais dias de evolução estudados, o que pode ser observado através das figs. 14, 15 e 16.

Para maior exatidão das informações, procedeu-se à contagem dos grãos de prata reduzida no interior dos fibroblastos, de 10 áreas iguais de tecido para todos os tempos em estudo, por meio de uma ocular apropriada. Essa contagem produziu os resultados transcritos na tabela I, a seguir:

TABELA I : Contagem dos grãos de prata reduzida/100 μm^2 , nos diferentes dias de evolução do tecido de granulação.

DIAS	GRÃOS/100 μm^2
5	6 $\pm$ 0,88
10	9 $\pm$ 0,69
15	13 $\pm$ 0,61
20	13 $\pm$ 0,45
25	4 $\pm$ 0,73
30	3 $\pm$ 0,44
35	2 $\pm$ 0,82
40	2 $\pm$ 0,66

Do exame dos resultados constantes na tabela I, foi possível confirmar-se que, realmente, a síntese de colágeno foi mais intensa no período compreendido entre 15 e 20 dias de evolução do tecido de granulação, e que nos intervalos de tempo posteriores, essa síntese decaiu de maneira acentuada, para valores inferiores aos primeiros 20 dias de desenvolvimento do tecido.

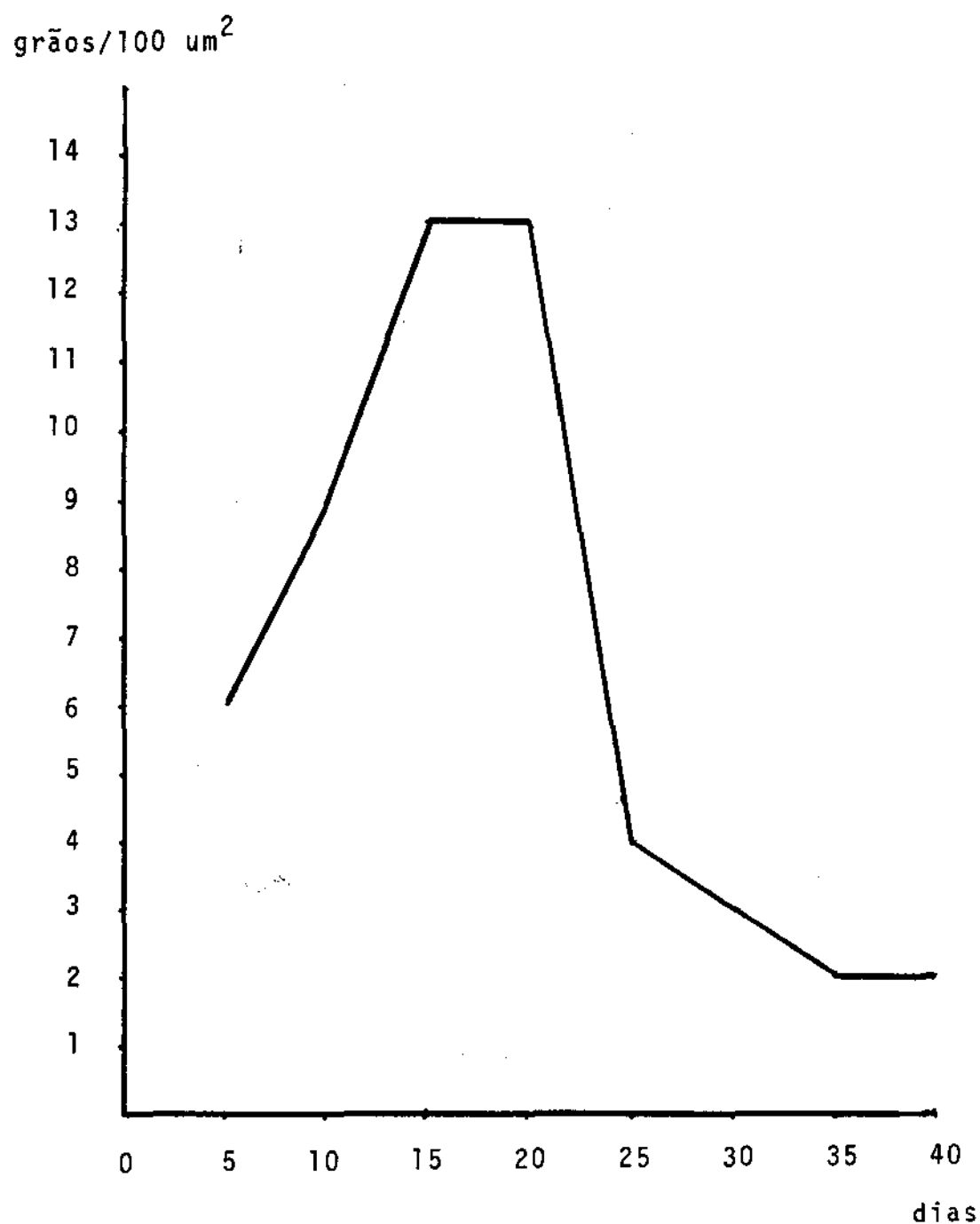


GRÁFICO I - Curva obtida através das contagens de grãos de prata /100 μm^2 no tecido de granulação dos diferentes dias, radioautografados pela prolina - ^3H .

4.3 - TÉCNICA HISTOFOTOMÉTRICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE MUCO - POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

Tratamento estatístico dos dados:

As medidas obtidas por meio das observações histofotométricas das lâminas de tecido de granulação nos diferentes dias de evolução estudados podem ser encontrados no apêndice deste trabalho.

Tomando-se por base os dados obtidos através da histofotometria, foram então calculados as médias, as variâncias e os coeficientes de variação. Esses valores podem ser observados pelo exame da tabela II exposta a seguir:

TABELA II: Médias ($\bar{x}$), variâncias (s^2) e coeficientes de variação (CV) relativos a 20 medidas histofotométricas obtidas para cada uma de 3 lâminas diferentes, em diferentes dias de observação.

Lâminas Dias	Repetições								
	1			2			3		
	$\bar{x}$	s^2	CV	$\bar{x}$	s^2	CV	$\bar{x}$	s^2	CV
5	81,6	31,68	6,80	81,0	31,41	6,91	81,3	32,82	7,03
10	74,0	10,27	4,32	73,8	9,40	4,14	73,8	8,83	4,02
15	66,9	22,11	7,02	65,8	13,04	5,48	66,2	7,46	4,12
20	57,4	6,97	4,59	56,5	5,06	3,96	56,5	4,59	3,78
25	70,9	5,50	3,30	70,9	1,62	1,79	70,9	1,89	1,93
30	75,1	8,85	3,95	75,2	7,67	3,67	74,3	6,37	3,39
35	75,1	10,23	4,24	75,3	9,78	4,14	75,3	8,05	3,75
40	75,1	11,26	4,46	75,0	8,98	3,98	76,2	11,43	4,43

Conforme pode ser observado pelo exame da tabela I, as variâncias são semelhantes, com exceção daquelas obtidas para o tecido de granulação de 5 dias de evolução.

A seguir, procedeu-se à análise de variância, com um critério de classificação (dias), usando-se como unidades experimentais as médias relativas às 20 medidas histofotométricas de cada lâmina, nos diferentes dias de observação da evolução do tecido. Através dessa análise, chegou-se a um valor de F igual a 970,47, significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Em seguida, foi aplicado o teste t de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, a fim de se comparar as médias que constam na tabela III, cujo valor para o estudo em questão foi de 6,08.

TABELA III: Médias relativas às medidas histofotométricas obtidas em 3 diferentes lâminas, em diferentes dias de observação.

DIAS	MÉDIAS	DIAS	MÉDIAS
5	81,3	25	70,9
10	73,8	30	74,8
15	66,3	35	75,2
20	56,8	40	75,4

Por meio do teste t de Tukey, verificou-se que, em média, as medidas histofotométricas obtidas do tecido de granulação de 5 dias são significativamente maiores que as medidas obtidas em todos os demais dias de evolução observados.

Foi observado também, que a média relativa às medidas -

histofotométricas obtidas do tecido de granulação de 20 dias é significativamente menor que as médias relativas aos tecidos de 25, 30, 35 e 40 dias.

O teste t de Tukey também mostrou que, em média, os valores obtidos para os 10 dias são significativamente maiores - que os valores obtidos para os tecidos de 15 e 20 dias.

Verificou-se ainda que a média relativa ao tecido de 15 dias, significativamente maior que a média obtida aos 20 dias, é, entretanto, menor que as médias encontradas para os tecidos - de 30, 35 e 40 dias de evolução.

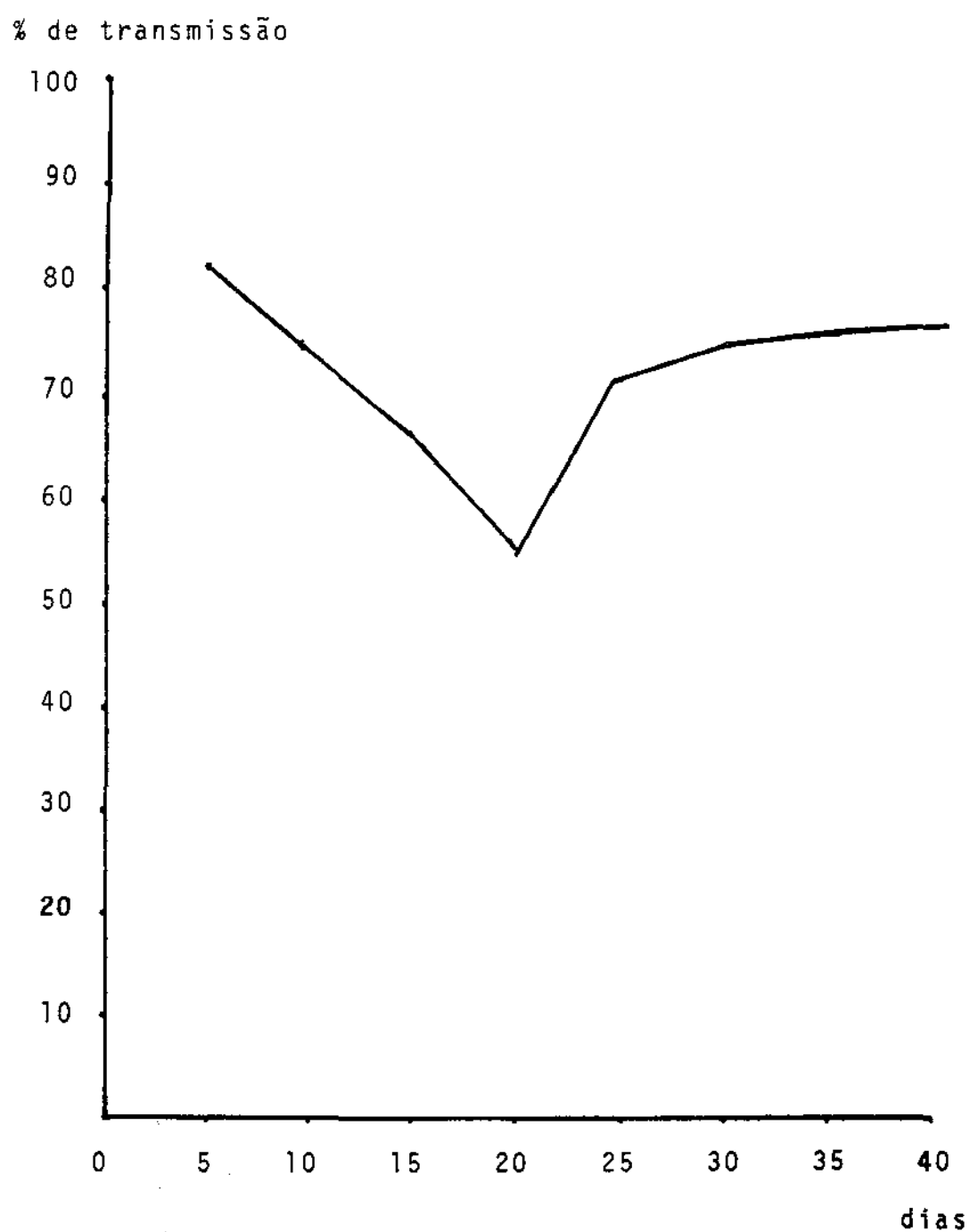


GRÁFICO II- Curva obtida através das medidas histofotométricas (% de transmissão de luz) no tecido de granulação dos diferentes dias, corado pelo azul de toluidina.

4.4 - HISTOQUIMICA DAS FOSFOMONOESTERASES

4.4.1 - Fosfatase alcalina:

Pela técnica de DANIELLI, a atividade da fosfatase alcalina é demonstrada por meio de um precipitado negro nos sítios de atividade.

5 dias -: o aspecto geral do tecido de granulação (fig. 19) mostrou forte atividade enzimática nos fibroblastos da cápsula fibrosa, bem como nas células inflamatórias e na rede de fibrina existentes no interior da esponja. Não houve sinal algum de atividade da fosfatase alcalina no tecido proliferado, ainda bastante incipiente.

10 dias -: com o aparecimento das fibras de colágeno, notou-se grande atividade do enzima nas fibras em proliferação (fig. 20). Os fibroblastos em franca atividade exibiram reação positiva, conforme pode ser visto na fig. 27. Também as paredes dos vasos neo-formados mostraram forte atividade (fig. 28).

15 dias -: a atividade da fosfatase alcalina foi bastante evidente nas fibras colágenas do tecido em evolução, o que pode ser observado através da fig. 21. Essa atividade pode ser melhor avaliada pelo exame da fig. 29, onde se nota também a presença de fibroblastos e células angioblásticas exibindo forte reação.

20 dias -: a atividade enzimática atingiu o seu ponto máximo nas fibras colágenas, conforme demonstrado na fig. 22. A fosfatase alcalina esteve ativamente presente em todas as fibras do tecido em evolução. Fibroblastos e paredes capilares seguiram exibindo atividade.

25 dias -: houve uma queda brusca da atividade do

enzima nas fibras do tecido (fig. 23), bem como nos fibroblastos e paredes capilares. A esta altura, tornou-se bem evidente a atividade da fosfatase alcalina localizada nos macrófagos do tecido.

30 dias -: quase nenhuma atividade enzimática foi observada nas fibras do tecido já completamente formado (fig.24). Apenas os macrófagos continuaram a exibir positividade à reação.

35 e 40 dias -: a reação à fosfatase alcalina desapareceu completamente do tecido (figs. 25 e 26), sendo que as fibras colágenas mostraram-se totalmente negativas à reação enzimática (fig. 30). A atividade da fosfatase alcalina foi detectada somente nos macrófagos.

4.4.2 - Fosfatase ácida:

A atividade da fosfatase ácida é também evidenciada pela formação de um precipitado negro nos locais de reação. A técnica para evidenciação da atividade deste enzima mostrou, em todos os dias de evolução do tecido, uma total ausência de reação nas fibras colágenas, paredes de vasos, células inflamatórias e fibroblastos, conforme observado na série de figuras de 31 a 38.

A única reação positiva à fosfatase ácida foi notada nos macrófagos do tecido, a partir dos 15 dias, permanecendo invariável até os 40 dias. Os macrófagos exibindo forte reação positiva podem ser observados nas figuras 39, 40, 41 e 42.

4.4.3 - Adenosin-trifosfatase (ATPase):

A atividade da ATPase é também detectada por meio de um precipitado negro-pardacento nos locais de reação. Obteve-se os seguintes resultados nos diferentes dias de evolução do te

cido de granulação:

5 dias -: reação absolutamente negativa em todos os locais do tecido (fig. 43).

10 dias -: intensa reação positiva à ATPase, em todo o tecido proliferado. A reação positiva localizou-se principalmente na periferia do tecido, junto à cápsula fibrosa, sendo notada nas paredes dos capilares neo-formados de forma bastante intensa (fig. 44). Essa reação positiva à ATPase nas paredes dos capilares mostrou uma verdadeira rede capilar no tecido (fig. 51). Um exame microscópico em maior aumento revelou que as células inflamatórias e os fibroblastos do tecido também apresentaram reação positiva à ATPase (fig. 52).

15 dias -: os mesmos aspectos relatados para os 10 dias persistiram, com maior intensidade, aos 15 dias, nos mesmos locais (fig. 45).

20 dias -: houve uma queda na intensidade da reação positiva das paredes capilares, embora os elementos celulares continuassem exibindo reação positiva. Ao mesmo tempo, os locais de reação já apontados começaram a apresentar perda de detalhes, com uma aparente difusão da reação aos espaços intersticiais (fig. 46).

25 dias -: a intensidade da reação positiva à ATPase continuou decrescendo nas paredes capilares (fig. 53) e também no aspecto geral do tecido (fig. 47).

30, 35 e 40 dias -: nestes tempos, o tecido apresentou pequena reação nas paredes capilares e nos fibroblastos, aspectos que podem ser observados nas figuras 48, 49, 50 e 54.

4.4.4 - 5'- Nucleotidase:

A atividade da 5'- nucleotidase produz um precipitado negro-pardacento nos sítios de atividade enzimática.

5 dias -: a atividade da 5'- nucleotidase foi observada desde o início da proliferação tecidual, principalmente nas paredes capilares. O tecido ao redor dos capilares apresentou - difusão do enzima. As células leucocitárias do infiltrado inflamatório mostram atividade nuclear intensa, principalmente os neutrófilos. Uma vista geral do tecido aos 5 dias de evolução pode ser apreciada na fig. 55.

10 dias -: grande atividade enzimática nas paredes - dos capilares neo-formados, núcleos de fibroblastos e células mesenquimais (fig. 56). Isso provocou a evidenciação de uma rede capilar, que pode ser vista em maior aumento na fig. 63.

15 dias -: a máxima intensidade da atividade da 5' - nucleotidase foi atingida nesta fase, nos mesmos locais já apontados (fig. 57). Um aspecto mais detalhado dos vasos e dos elementos celulares pode ser visto respectivamente nas figuras 64 e 65.

20 dias -: a este tempo, o tecido de granulação apresentou os mesmos aspectos de 15 dias, acusando apenas um ligeiro decréscimo na intensidade da reação (fig. 58).

25 dias -: a intensidade da reação positiva à 5'-nucleotidase continuou decrescendo (fig. 59). Nas paredes capilares essa queda da reação pode ser bem observada (fig. 66).

30 dias -: queda drástica da atividade da 5'- nucleotidase, presente apenas nas paredes capilares (fig. 60).

35 e 40 dias -: houve desaparecimento quase total da atividade do enzima, que permaneceu apenas nas paredes de alguns capilares isolados (figs. 61 e 62).

4.4.5 - Glucose-6-fosfatase:

Os resultados obtidos por meio desta técnica mostraram total ausência de atividade enzimática tanto nas paredes capilares quanto nas fibras colágenas e células fibroblásticas e - inflamatórias leucocitárias (figs. de 67 a 74). Conforme já referido anteriormente nos resultados obtidos para as fosfatases ácida e alcalina, a partir de 15 dias houve reação positiva ã atividade da glucose-6-fosfatase nos macrófagos do tecido, o que pode ser apreciado nas figuras 75, 76, 77 e 78.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

A formação do tecido de granulação intra-esponja inicia-se entre o 3º e o 4º dia pós-implantação, através da migração de células fibrogenéticas e totipotentes originárias da cápsula fibrosa reacional, com subsequente proliferação desses elementos celulares até por volta de 15 a 20 dias, quando então a fase proliferativa propriamente dita termina e estabelece-se a organização e maturação do tecido (GRINDLEY & WAUGH, 1951; DUNPHY & UDUPA, 1955; CHVAPIL, 1967; HICKS, 1969; FEHER et alii, 1971; VIZIOLI, 1971, 1973; FUKUHARA, 1972; PEDERSEN & VIIDIK, 1972).

É oportuno salientar que o tecido de granulação somente invade completamente todos os espaços da esponja por volta de 15 dias de evolução; a partir dos 25 dias, pode-se considerar o tecido organizado, muito embora, conforme já salientado, algumas características físicas do colágeno só sejam atingidas após 2 ou 3 meses (SANDBERG, 1963; DOUGLAS et alii, 1969).

Ainda por volta dos 25 dias, ou mais exatamente, após 3 semanas de evolução, a população celular sofre uma queda apreciável, principalmente no que concerne aos fibroblastos (CHVAPIL, 1967; Mc MINN, 1969; VIZIOLI, 1971, 1973), o que foi plenamente comprovado nesta pesquisa.

A partir de 25 dias, o tecido de granulação começa a contrair-se devido ao início da fase denominada por ROSTOCK (1950) e CAMPANI, ZONTA & UGAZIO (1959) de fase "regenerativa" e por KULONEN (1965) de fase de "involução", caracterizada por um

aumento da fibroplasia, o que leva à cicatrização final. Ressal-te-se, para reforço dessa afirmativa, que NOVELLI & ZINNARI (1968) comprovaram que o peso em gramas de um granuloma experimental - passou de 2,012g aos 21 dias para 1,616g aos 28 dias de desenvolvimento. Os resultados morfológicos desta pesquisa sugerem fortemente a fibroplasia aumentada após 20 dias.

Baseando-se nessas investigações e nos resultados conseguidos através dos estudos morfológicos realizados, pode-se afirmar que a fase mais ativa da proliferação do tecido de granulação persiste até por volta de 20 dias de evolução, particularmente no período compreendido entre 10 e 20 dias, quando os vasos neo-formados iniciam a sua função de nutrição completamente, conforme demonstrado pela observação de hemácias no seu interior.

5.2 - TÉCNICA RADIOAUTOGRÁFICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE COLÁGENO.

Os estudos radioautográficos demonstraram que a síntese de colágeno no tecido de granulação é bastante ativa desde os primeiros dias, atingindo o pico máximo entre 15 - 20 dias, conforme comprovado pela contagem de grãos de prata reduzida no interior dos fibroblastos.

A incorporação da prolina-³H pelos fibroblastos foi observada já a partir dos 5 dias de evolução do tecido, resultado esse que é concorde com os achados de ROSS (1965), que detectou ativa incorporação de 3,4-³H-L-prolina nos fibroblastos presentes no processo de reparo de feridas de 7 dias no rato.

A quantidade de grãos de prata reduzida no interior dos fibroblastos cresce em uma progressão aritmética até atingir o máximo entre 15 - 20 dias, evidentemente através do pro -

gressivo aumento do número de células do tecido, comprovando portanto que a síntese de colágeno é maior durante esse período. Isto está plenamente de acordo com os achados de KULONEN (1965), que, trabalhando com prolina - ^{14}C em tecido de granulação provocado por implantação de esponja, mostrou que, entre 15 e 20 dias a capacidade do tecido em incorporar o isótopo é 3 vezes maior - que nos períodos de tempo seguintes.

Passadas 3 semanas, a atividade de síntese pelos fibroblastos diminui bruscamente, caindo a níveis inferiores aos primeiros 10 dias. Confrontando-se os resultados obtidos através da radioautografia com os resultados morfológicos, encontra-se total concordância no que concerne ao período ativo de síntese de colágeno, demonstrado pela incorporação do isótopo e os aspectos gerais do tecido, evidenciados pela hematoxilina-eosina.

5.3 - TÉCNICA HISTOFOTOMÉTRICA PARA ESTUDOS DA SÍNTESE DE MUCOPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

A análise estatística realizada permite afirmar-se - com segurança que, aos 5 dias, a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos é significativamente menor que a quantidade dessas substâncias nos demais dias estudados. Tal resultado pode ser explicado, obviamente, pelo fato que a esse tempo, o tecido incipiente não sintetizou a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos que atinge nos dias subsequentes, com o aumento do número de fibroblastos no tecido, o que provoca um aumento no conteúdo de mucopolissacarídeos ácidos e glicoproteínas no tecido (FEHER & JAKAB, 1972). Segundo JACKSON et alii (1960), uma grande quantidade de mucopolissacarídeos ácidos não é tão essencial à agregação de colágeno durante a cura. KODICEK & LOEWI (1955), SLACK (1957) e BENTLEY (1967) mostraram que o conteúdo de MPA cresce progressi

vamente a partir do 5º dia de reparação, o que está de acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa. No entanto, GOLDIN & JOSEPH (1968) afirmaram que dentro de 4 dias, no processo inflamatório, a reagregação da substância fundamental que foi desagregada pela agressão atinge até 90% do seu valor inicial, sendo que os restantes 10% se reagregam dentro de 21 dias. Esta opinião não está absolutamente de acordo com os resultados aqui expressados.

É fato conhecido que a reagregação da substância fundamental e sua conseqüente ligação química com as macromoléculas de colágeno diminui a capacidade reativa do tecido à coloração metacromática, pois os radicais livres em condições de reagir e se ligar às moléculas de corante diminuem (VIDAL, 1964, 1966; VIZIOLI, 1968; VALDRIGHI, 1968, 1972). Desse modo, depois de 4 dias, os mucopolissacarídeos ácidos já reagregados em sua quase totalidade não permitiriam que houvesse um aumento da intensidade da reação metacromática detectada através de um método sensível como a histofotometria.

É estatisticamente significativo o resultado encontrado para o tecido de granulação de 15 e 20 dias, cujas médias histofotométricas de transmissão de luz são menores que aquelas encontradas para os dias de evolução anteriores e posteriores. Isso significa que a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos do tecido nesses dias de evolução é maior que a quantidade dessas substâncias nos tecidos dos demais dias. Aliás, é fato concorde entre a maioria dos autores que pesquisaram o assunto que a síntese de mucopolissacarídeos ácidos nos tecidos de granulação atinge seu máximo entre os 15 e 20 dias de desenvolvimento (HUCK, 1949; KODICEK & LOEWI, 1955; SLACK, 1957; BENTLEY, 1967 ;

VIZIOLI, 1971).

É evidente que algumas afirmações referentes à pesquisa dos mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação estão sujeitas a críticas. JACKSON & BENTLEY (1960) afirmaram que uma parte da hesoxamina contida no processo é originária de mucoproteínas sêricas, duvidando mesmo que exista uma verdadeira síntese dessas substâncias no tecido de granulação.

No entanto, as opiniões desses autores foi em grande parte rebatida por HAUSS & HULSING (1961, a,b), que provaram que existe, nos processos de reparo, um aumento no metabolismo dos - mucopolissacarídeos ácidos sulfatados, através de experiências - com ^{35}S , e também por BARTLEY, BIRT & BANKS (1971) que, comentando a biosíntese dos mucopolissacarídeos, afirmaram que a implantação de corpos estranhos, como cilindros de aço reticulares, subcutaneamente, é um dos caminhos para a indução dessa biosíntese, onde a glucosamina - ^{14}C é incorporada ao material neo-sintetizado.

Portanto, baseando-se nos resultados da presente pesquisa, confirmados pela maioria dos autores, pode-se afirmar que nos processos de granulação provocados por implantação de esponja, a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos existentes aumenta progressivamente durante a evolução do tecido, até atingir um máximo no espaço compreendido entre 15 e 20 dias, decaindo posteriormente e mantendo-se então dentro de um nível relativamente uniforme a partir de 25 dias de evolução.

5.4 - HISTOQUIMICA DAS FOSFOMONOESTERASES

5.4.1 - FOSFATASE ALCALINA

As fosfatases são enzimas responsáveis pela hidrólise dos ésteres fosfóricos. Elas são divididas de acordo com o seu pH ótimo "in vitro". As fosfatases que agem no lado alcalino da neutralidade, principalmente a níveis de pH 9 e acima, são conhecidas como fosfatases alcalinas.

É provável que a atividade "in vivo" mais importante das fosfatases esteja relacionada com a transferência de fosfato de um álcool a outro.

Dos resultados obtidos pela presente pesquisa, ficou claro que a atividade da fosfatase alcalina esteve presente no tecido de granulação desde os 5 dias, muito embora aos 3 dias ela já se manifeste nas células inflamatórias que migram da cápsula fibrosa para o interior da esponja (VIZIOLI et alii, 1972; VANDER PLOEG, 1972). Essa atividade da fosfatase alcalina nas células inflamatórias em estágios iniciais de processos de reparo - foi também detectada por TODO (1968) em alvéolos dentários pós-extração.

Os estudos enzimáticos realizados em fases ainda mais precoces da cura de feridas por RAEKALLIO (1960) mostraram atividade da fosfatase alcalina após 8 horas da produção da ferida, e exatamente nos polimorfonucleares migrantes para a zona alterada. Segundo este autor, a fosfatase alcalina estaria, nestes estágios precoces, funcionando como uma "barreira defensiva". De qualquer maneira, a fosfatase alcalina comprovadamente está presente nas células inflamatórias, desde muito cedo.

A presença de atividade enzimática na rede de fibrina

que faz parte do exsudato inflamatório inicial pode ser explicada através da adsorção do enzima existente nos fluidos locais , conforme proposto por GOLD & GOULD (1951).

Aos 10 dias de evolução, no entanto, as fibras coláge_unas e os fibroblastos apresentaram sinais de grande atividade en_uzimática. É fato conhecido que a fosfatase alcalina está intima_umente relacionada com células que realizam síntese de proteínas (DEMPSEY & WISLOCKI, 1946; MOOG, 1946; SAKAMOTO, 1959; CABRINI & CARRANZA, 1963; GIBSON & FULLMER, 1967; LEONARD & PROVENZA, 1970) o que explica a sua presença nos fibroblastos.

A atividade da fosfatase alcalina crescente nas fi - bras colágenas foi descrita por muitos autores que pesquisaram o assunto (FELL & DANIELLI, 1943; GOLD & GOULD, 1951; JOHNSON & Mc MINN, 1958; GOULD, 1960; TODO, 1968; VIZIOLI et alii, 1972), que sugeriram que haveria uma íntima relação entre a neo-formação de fibras colágenas e a atividade detectada do enzima.

MARCHANT (1949) constatou a presença da fosfatase alcalina durante a fibrogênese, mas não relacionou essa presença - com a formação de colágeno, enquanto ROBERTSON et alii (1950), em bora confirmando a presença do enzima nos fibroblastos em síntese de colágeno, sugeriram : "isso poderia muito bem ser um artifício de técnica", mas não explicam como nem porque. Baseando - se nos trabalhos constantes da literatura e nos resultados desta pesquisa, as opiniões de MARCHANT e ROBERTSON et alii não pare - cem resistir a uma análise mais profunda.

Por outro lado, WOESSNER & BOUCEK (1961), por meio de estudos bioquímicos, demonstraram que, em tecido de granulação - provocado por implantação de esponja, a atividade da fosfatase - alcalina aumenta rapidamente a partir de 8 dias de desenvolvimen_u

to, atingindo o máximo por volta dos 15 a 20 dias, e decaindo em seguida. Argumentam em sequencia que a fosfatase alcalina não está relacionada com a síntese de colágeno por que esta continua se desenvolvendo muito depois dos 20 dias, quando o nível de fosfatase alcalina vai declinando. De acordo com os resultados desta pesquisa, demonstrados tanto morfológicamente quanto por meio da radioautografia, a síntese de colágeno também sofre queda acentuada após os 20 dias. Assim, não se pode concordar com WOESNER & BOUCEK quanto à sua interpretação da questão, embora seja bastante significativa a presença da fosfatase alcalina por eles detectada no tecido de granulação, exatamente coincidente com o período de atividade encontrado nos resultados deste trabalho.

Um fato que deve ser bem analisado, tornado bastante evidente pelos resultados desta pesquisa, é a relação clara e sugestiva que existe entre o pico máximo da atividade de síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos, com a máxima atividade da fosfatase alcalina na formação do tecido de granulação. Tais pontos de referencia coincidem no período compreendido entre 15 e 20 dias, mostrando perfeitamente que não se trata de mera coincidência ou artificios de técnica. Levando-se em conta - que a agregação do colágeno sob a forma de feixes não pode prescindir da presença de mucopolissacarídeos ácidos, necessários a essa agregação, é altamente provável que a atividade da fosfatase alcalina seja indispensável a esse processo de agregação, agindo em algum ponto da formação das cadeias de carboidratos e, consequentemente, da formação dos mucopolissacarídeos ácidos.

Dessa maneira, a fosfatase alcalina estará relacionada não com a síntese ou a polimerização das fibras de colágeno, mas com o processo de agregação das fibras em forma de feixes, realizada por meio dos mucopolissacarídeos ácidos. Isso explica -

inclusive por que, aos 5 dias, embora haja no tecido um ativo - processo de síntese de proteínas e carboidratos, não há atividade da fosfatase alcalina, pois o tecido neo-sintetizado ainda - não iniciou o processo de agregação. Do mesmo modo, após os 20 dias, com a organização macromolecular já estabelecida (VIZIOLI, 1971), a atividade da fosfatase alcalina sofre queda abrupta, - pois já não é tão necessária.

Quanto à presença da atividade enzimática detectada - nas paredes dos capilares em neo-formação, GOMORI (1941) já se referia às paredes dos vasos como sendo o sítio mais comum de atividade do enzima, que, além disso, está relacionada com a proliferação dos angioblastos, conforme já discutido anteriormente.

5.4.2 - FOSFATASE ÁCIDA

A atividade da fosfatase ácida na gênese e evolução - do tecido de granulação foi totalmente ausente, não sendo detectada durante o processo de neo-formação de proteínas colagenosas, nem durante a agregação e orientação macromolecular final do complexo colágeno-mucopolissacarídeos ácidos.

GOMORI (1941) relatou que a atividade da fosfatase ácida foi detectada nos macrófagos do tecido de granulação, o que está de acordo com os resultados do presente trabalho. RAEKALLIO (1960) detectou, nas fases precoces da cura de feridas, atividade do enzima no epitélio da zona injuriada 4 horas após a agressão, aumentando até 16 horas depois, quando decaiu. A propósito, um estudo feito por CABRINI & CARRANZA (1958) em gengivas - normais e cronicamente inflamadas mostraram atividade da fosfatase ácida unicamente no epitélio, não havendo atividade enzimática no conjuntivo. Tal relação entre a fosfatase ácida e tecido

epitelial foi também comunicada por SILVERMAN & KEARNS (1970).

Também IM, HOOPES & SOHN (1972), investigando a fosfatase ácida em cura de feridas de pele, mostraram que a atividade desse enzima estava relacionada unicamente com o epitélio, sem nenhum sinal de reação positiva no tecido conjuntivo. Esse fato foi também sugerido por LISANTI (1960).

Torna-se pois bastante claro que a fosfatase ácida - não é absolutamente um enzima ativo durante os processos de síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação, nem participa da organização estrutural final do tecido.

A partir dos 15 dias de evolução do granuloma, a atividade da fosfatase ácida foi detectada no interior dos macrófagos recém surgidos. Isso confirma as evidências de que o enzima está contido nos lisossomas dessas células.

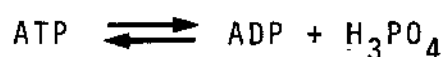
Estas afirmações encontram suporte em muitos achados concernentes às investigações sobre a fosfatase ácida contida em lisossomas de células inflamatórias e células de rim, baço, fígado, trato intestinal e medula, de acordo com PALADE (1951), FULLMER (1966 a,b), HAYASHI (1967), KATCHBURIAN, KATCHBURIAN & PEARSE (1967), GIBSON & FULLMER (1967), PALKAMA & RECHARDT (1970), LI, YAM & LAM (1970 a, b), HANKER et alii (1972) e SASAKI & FISHMAN (1972).

Como a reação positiva à fosfatase ácida foi detectada **unicamente** nos macrófagos, que surgiram somente aos 15 dias, recorde-se que esse é exatamente o período de tempo no qual foi detectada a atividade máxima da síntese dos mucopolissacarídeos ácidos. Essa observação, aliada aos dados constantes na literatura, segundo os quais os mucopolissacarídeos ácidos fazem -

parte da membrana dos lisossomas, e sabendo-se que o primeiro - passo da hidrólise dos mucopolissacarídeos ácidos ocorre nessas organelas, a teoria mais plausível é que a detecção da atividade da fosfatase ácida está ligada à formação de lisossomas nos macrofagos observados.

5.4.3 - ADENOSIN-TRIFOSFATASE (ATPase)

As ATPases (são diversas) catalisam a hidrólise do ATP em adenosin-difosfato (ADP) e ortofosfato.



Segundo LISON (1960), a técnica de Wachstein & Meisel é a que fornece melhores resultados para a pesquisa deste enzima, embora forneça apenas 15% do valor total da atividade enzimática.

Os dados obtidos na determinação da atividade do enzima apresentaram coerência com o desenvolvimento da síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação.

Conforme se observou através dos resultados, a atividade enzimática não foi detectada aos 5 dias, somente aparecendo com relativa intensidade aos 10 dias e atingindo o máximo aos 15 dias, mantendo-se em nível mais ou menos uniforme até 20 dias, embora decrescendo um pouco nas paredes capilares.

É conveniente que seja ressaltado o fato que a ATPase somente foi pesquisada em processos de cura de feridas por RAE - KALLIO & LEVONEN (1963 a, b), assim mesmo em fases precoces (detectada após 60 minutos da injúria), sendo que estes autores também sugeriram que o aumento da atividade geral dos enzimas funcionaria como um mecanismo de defesa pelas células do tecido conjuntivo local.

Não se conseguiu, na literatura corrente, nenhuma re-

ferencia à atividade da ATPase em tecidos de granulação provocados por corpos estranhos.

Mesmo assim, em ligamento periodontal, onde a atividade metabólica é grande, GIBSON & FULLMER (1967) e GIBSON (1970) assinalaram forte atividade da ATPase em células fibrogenéticas e nas paredes dos vasos, o que está de acordo com os resultados deste trabalho. A atividade da ATPase nas paredes celulares foi também apontada por KOENIG & VIAL (1970) e BERG, LYON & CAMPBELL (1972), enquanto a atividade nos macrófagos e células inflamatórias foi detectada por POELMANN & DAEMS (1973).

De uma maneira geral, todos os trabalhos acima citados são ou simples constatação da presença do enzima, ou trabalhos pertinentes a técnicas de demonstração do enzima e problemas correlatos.

Entretanto, os resultados alcançados nesta pesquisa permitem afirmar-se que o aumento progressivo da atividade da ATPase em ritmo uniforme com a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação está relacionado com o papel do ATP como fonte de energia para os processos de síntese do tecido em desenvolvimento.

A atividade da ATPase diretamente ligada às paredes dos vasos neo-formados e células fibrogenéticas, observada nos cortes histológicos estudados pode ser explicada em vista da atividade metabólica acelerada desenvolvida pelo tecido, e paralelamente, pela ativação dos mecanismos de transporte.

A energia necessária para o desencadeamento de tais mecanismos de transporte ativo é fornecida pelas células através do ATP. Esse nucleotídeo, portanto, está aumentado quando o processo de transporte está acelerado, e, conseqüentemente, a atividade da ATPase também aumenta.

À medida que o metabolismo tecidual diminui de intensidade, com a diminuição dos processos de síntese e transporte, diminui também a atividade da ATPase que passa, a partir de 3 semanas de evolução do tecido, a manter atividade aparentemente normal do tecido já organizado.

5.4.4 - 5'-NUCLEOTIDASE

Este enzima, que age especificamente sobre a ligação glucídio-fosfato em posição 5 é a melhor caracterizada das fosfatases específicas e aquela onde a especificidade histoquímica é melhor estabelecida, utilizando-se como substrato o adenosin-5-fosfato (ácido adenílico do músculo) (LISON, 1960).

Os testes histoquímicos realizados com a finalidade de se detectar a atividade da 5'-nucleotidase no tecido de granulação em desenvolvimento apresentou uma curva de atividade coerente com o impulso metabólico observado.

Em outras palavras, a 5'-nucleotidase mostrou atividade logo nas primeiras observações aos 5 dias, atingindo o máximo aos 15 dias, decaindo posteriormente em ritmo mais lento que aquele observado para as demais fosfomonoesterases, desaparecendo entre 35 e 40 dias.

Os resultados obtidos vem ao encontro do que seria de se esperar, em vista da intensa atividade metabólica observada nos tecidos em síntese, a qual é obviamente acompanhada pela aceleração da síntese dos ácidos nucleicos, e consequente aumento do giro dos nucleotídeos. Dessa maneira, a atividade observada nos fibroblastos e demais células em síntese no tecido de granulação demonstra claramente o ritmo metabólico intenso desde os primeiros dias de evolução.

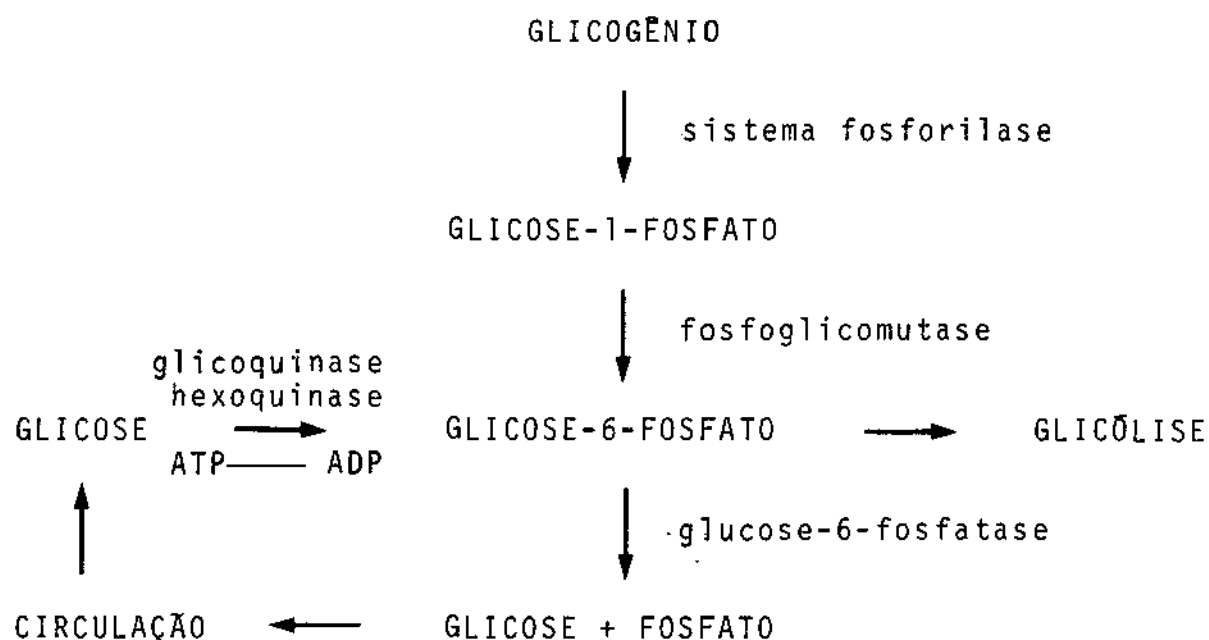
GIBSON (1970), estudando as atividades enzimáticas do periodonto normal, encontrou reação positiva à 5'-nucleotidase - em osteócitos, cementócitos e restos epiteliais de Malassez. Em um estudo prévio, GIBSON & FULLMER (1967) haviam detectado, em ossos e dentes, a atividade da 5'-nucleotidase também intracelularmente, em odontoblastos e condrocitos da cartilagem articular. Segundo esses autores, muitas dessas células, bem como, por exemplo, os restos epiteliais de Malassez, podem ser considerados como em estado de latência, fora da corrente principal do metabolismo. Consideram pois que, nesses casos, a atividade da 5'-nucleotidase representaria uma via de energia diferente da rota normal para a síntese do ATP.

No entanto, parece não haver dúvidas sobre o papel da 5'-nucleotidase nos tecidos em desenvolvimento. A atividade do enzima nas paredes dos vasos em neo-formação pode ser considerada como resultado da proliferação intensa das células angioblásticas, o que é comprovado pela queda da intensidade da reação - quando os vasos, paulatinamente, atingem o estado funcional.

5.4.5 - GLUCOSE-6-FOSFATASE

Conforme se pode analisar pelos resultados obtidos para esta fosfomonoesterase, ela não foi detectada nos elementos em proliferação durante a evolução do tecido de granulação.

Visto que o tecido em questão não é caracterizado pelo acúmulo de glicogênio, essa ausência da atividade do enzima - pode ser compreendida, pois a glucose-6-fosfato é a responsável pela liberação de fosfato orgânico, conforme pode ser observado através do esquema seguinte:



Portanto, a atividade desse enzima concentra-se nos tecidos responsáveis pelo armazenamento do glicogênio. Cite-se os trabalhos desenvolvidos por KARKOLA (1972), que, investigando atividades de diversos enzimas no processo de reparo do fígado, encontrou grande atividade de glucose-6-fosfatase nos fibroblastos em proliferação. Sendo o fígado o principal depósito de glicogênio do organismo, esses resultados são compreensíveis.

A partir de 15 dias de evolução, o tecido de granulacão mostrou grupos de macrófagos apresentando atividade de glucose-6-fosfatase. Isso pode ser explicado raciocinando-se que uma atividade relativamente ligeira da glucose-6-fosfatase pode acompanhar a glicólise, a fim de aliviar o acúmulo de glucose-6-fosfato, liberando glicose para a circulação, o que poderia justificar a atividade observada nos macrófagos.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - A síntese de colágeno no tecido de granulação induzido pela implantação de esponja de PVC tem início dentro dos primeiros 5 dias de evolução, aumentando progressivamente até atingir o máximo entre 15 e 20 dias, decaindo posteriormente.

6.2 - A síntese de mucopolissacarídeos ácidos segue os mesmos padrões da síntese de colágeno, relativamente ao tempo de evolução requerido, atingindo o máximo por volta de 15 a 20 dias, decaindo em seguida, com a organização macromolecular do tecido.

6.3 - Existe grande atividade da fosfatase alcalina no tecido de granulação. Essa atividade, ao que tudo indica, está condicionada ao desenvolvimento da síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos, atingindo o máximo entre 15 e 20 dias, com queda brusca após esse tempo.

6.4 - A atividade da fosfatase alcalina é intimamente relacionada ao processo de agregação do colágeno sob a forma de feixes, realizado por meio dos mucopolissacarídeos ácidos, agindo na formação das cadeias de carboidratos necessárias ao processo.

6.5 - A fosfatase ácida não participa dos processos de síntese e desenvolvimento do tecido de granulação. Sua presença em tal tecido parece estar limitada à atividade nos lisossomas celulares, em especial nos macrófagos.

6.6 - A adenosin-trifosfatase (ATPase) é essencial aos processos de síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. A sua atividade intracelular e nas paredes vasculares aumenta em concordância com as necessidades energéticas do tecido, atingindo o máximo aos 15 dias de desenvolvimento, caindo após 20 dias, seguindo o ritmo da síntese proteica e de carboidratos do tecido.

6.7 - A 5'-nucleotidase tem máxima importância na evolução do tecido de granulação, tendo a sua atividade uma sequência lógica com a síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos, começando já nos primeiros dias, atingindo o máximo aos 15 dias e decaindo paulatinamente após esse período, devido à aceleração da síntese dos ácidos nucleicos e consequente aumento do giro dos nucleotídeos.

6.8 - A glucose-6-fosfatase não é essencial ao processo de síntese de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação, que não está ligado aos mecanismos de acúmulo de glicogênio. A sua atividade restringe-se principalmente aos macrófagos do tecido.

RESUMO

O presente trabalho teve a finalidade de se pesquisar a presença e o possível papel do grupo enzimático das fosfomonoesterases no tecido de granulação induzido por implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) no tecido subcutâneo do rato.

O tecido de granulação foi estudado aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias de evolução. Foram realizados, com este material, os seguintes estudos: coloração com hematoxilina-eosina, para a investigação da morfologia do tecido de granulação; - radioautografia, para a pesquisa da síntese de colágeno, por meio da incorporação, pelos fibroblastos, de prolina-³H; técnica histofotométrica para investigar-se a síntese de mucopolissacarídeos ácidos por meio da coloração metacromática com azul de toluidina, pH 4; e, finalmente, histoquímica das seguintes fosfomonoesterases: fosfatase alcalina, fosfatase ácida, adenosin-trifosfatase (ATPase), 5'-nucleotidase e glucose-6-fosfatase.

Os resultados mostraram que a síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação inicia-se logo aos primeiros dias de desenvolvimento e atinge o ponto máximo entre 15 e 20 dias, decaindo visivelmente após esse tempo.

A pesquisa histoquímica das fosfomonoesterases demonstrou que a fosfatase alcalina tem atividade progressivamente crescente a partir dos 10 dias de evolução do tecido, atingindo o máximo de atividade aos 15 dias, mantendo-se até 20 dias, quando cai bruscamente. Essa atividade, coincidente com o período máximo de síntese de colágeno e de mucopolissacarídeos ácidos, demonstra que a fosfatase alcalina tem um papel importante na agregação do complexo colágeno-mucopolissacarídeos ácidos, agindo em algum

ponto da formação das cadeias de carboidratos e, consequentemente, da formação dos mucopolissacarídeos ácidos.

A ATPase e a 5'-nucleotidase também tem a sua atividade máxima no período entre 15 e 20 dias, sendo portanto relacionadas com os processos energéticos de alta intensidade, exigidos pelo tecido cujo metabolismo é muito ativo.

A fosfatase ácida foi detectada somente nos macrófagos do tecido, a partir de 15 dias de evolução, estando a sua atividade ligada aos lisossomas dessas células. A glucose-6-fosfatase também reage unicamente nos macrófagos, sendo que a sua atividade se deve provavelmente ao fato que uma atividade relativamente ligeira da glucose-6-fosfatase pode acompanhar o processo de glicólise, com a finalidade de aliviar o acúmulo de glucose-6-fosfato, liberando glicose para a circulação.

*

*

*

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTLEY, W.; BIRT, L.M.; BANKS, P.: The biochemistry of the tissues. London, John Wiley, 1971, p. 232.
- BENTLEY, J.P.: Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. Ann. Surg., 165 : 186-91, 1967.
- BERG, G.G.; LYON, D.; CAMPBELL, M.: Faster histochemical reaction for ATPase in presence of chloride salts, with studies of the mechanism of precipitation. J. Histochem. Cytochem., 20 : 39-55, 1972.
- BOLLET, A.J.; ANDERSON, D.V.; SIMPSON, W.F.: The measurement of tissue acid mucopolysaccharides. J. clin. Invest., 37 : 858-63, 1958.
- CAMPANI, M.; REGGIANINI, O.: Observations in experimental animal on the nature of the metachromatic ground substance in granulation tissue. J. Path. Bact., 62 : 563-71, 1950.
- CAMPANI, M.; ZONTA, A.; UGAZIO, G.: apud CHVAPIL, M.: Physiology of connective tissue. London, Butterworths, 1967, p. 258.
- CABRINI, R.L.; CARRANZA, F.A. Jr.: Histochemical distribution of acid phosphatase in human gingiva. J. Periodont., 29 : 34-7, 1958.
- CHVAPIL, M.: Physiology of connective tissue. London, Butterworths, 1967, p. 258-86.
- DANIELLI, J.F.: General cytochemical methods. New York, Academic Press, 1958. v. 1, p. 423.
- DELAUNAY, A.; BAZIN, S.: Mucopolysaccharides, collagen and non fibrillar proteins in inflammation. International Review of Connective Tissue Research, New York, Hall, Academic Press, 1964, p. 73.

- DEMPSEY, E.W.; WISLOCKI, G.B., apud GOLD, N.I.; GOULD, B.S.: Collagen fiber formation and alkaline phosphatase. Arch. bio-chem. biophys., 33 : 155-64, 1951.
- DOUGLAS, D.M.; FORRESTER, J.C.; OGILVIE, R.R.: Physical characteristics of collagen in the later stages of wound healing. - Brit. J. Surg., 56 : 219-22, 1969.
- DUNPHY, J.E.; UDUPA, K.N.: Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New Engl. J. Med., 253 : 847-52, 1955.
- FEHER, J.; JENNINGS, E.H.; RANNIE, I.: Histological study of fibrogenesis in experimental inflammation with special reference to elastic tissue formation. Br. J. exp. Path., 52 : 621-26, 1971.
- FEHER, J.; JAKAB, L.: The role of connective tissue cells in the metabolic changes of glycosaminoglycans and glycoprotein in experimental inflammation. Acta Morphol. Acad. Sci. Hung., 20 : 23-37, 1972.
- FELL, H.B.; DANIELLI, J.F.: The enzymes of healing wounds. I. The distribution of alkaline phosphomonoesterase in experimental wounds and burns in the rat. Br. J. exp. Path., 24 : 196 - 203, 1943.
- FROMM, H.S.: Distribution of sulfur in regenerating wound tissue. Proc. Soc. exp. Biol., 97 : 246-49, 1958.
- FUKUHARA, M.: Modifications of collagen and non fibrillar proteins and cathepsin activity in the carrageenin granuloma. - Path. Biol., 20 : 887-93, 1972.
- FULLMER, H.M.: Enzymes in mineralized tissues. Clin. Orth., 48 : 285-95, 1966a.
- FULLMER, H.M.: Histochemical studies of the periodontium. J. dent. Res., 45 : 469-77, 1966b.

- GIBSON, W.A.; FULLMER, H.M.: Histochemistry of the periodontal - ligament. II. The phosphatases. Periodontics, 5 : 226-32 , 1967.
- GOLD, N.I.; GOULD, B.S.: Collagen fiber formation and alkaline phosphatase. Arch. biochem. biophys., 33 : 155-64, 1951.
- GOLDIN, E.G.; JOSEPH, N.R.: Responses of connective tissue ground substance in wound healing. Arch. Surg., 97 : 753-63 , 1968.
- GOMORI, G.: Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. Arch. Path., 32 : 189-99, 1941.
- GOULD, B.S.: Biosynthesis of collagen. III. The direct action of ascorbic acid on hydroxyproline and collagen formation in - subcutaneous polyvinyl sponge implants in guinea pig. J. biol. Chem., 232 : 637-46, 1958.
- GOULD, B.S.: Ascorbic acid and collagen fiber formation. Vitamins and Hormones, 18 : 89-120, 1951.
- GRINDLEY, J.H.; WAUGH, J.M.: Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. Arch. Surg., 63 : 288-93, 1951.
- HAUSMANN, E.; NEUMANN, W.F.: Conversion of proline to hydroxyproline and its incorporation into collagen. J. biol. Chem., - 236 : 149-55, 1961.
- HANKER, J.S.; YATES, P.E.; CLAPP, D.H.; ANDERSON, W.A.: New methods for the demonstration of lysosomal hydrolases by the formation of osmium blacks. Histochemie, 30 : 201-14, 1972.
- HAUSS, W.H.; HULSING, G.J.: Veränderungen des Bindegewebsstoffwechsels durch toxische, infektiöse und allergische Einflüsse. Z. Rheumaforsch., 20 : 161-68, 1961 a.

- HAUSS, W.H.; HULSING, G.J.: Über die universelle unspezifische mesenchymreaktion. Dt. med. Wschr., 86 : 763-72, 1961 b.
- HAYASHI, M.: Comparative histochemical localization of lysosomal enzymes in rat tissues. J. Histochem. Cytochem., 15 :83-92, 1967.
- HICKS, R.: The evaluation of inflammation induced by material im-
planted subcutaneously in the rat. J. Pharm. Pharmac., 21 :
581-88, 1969.
- HUDACK, S.S.; BLUNT, J.W.; HIGBEER, P.; KEARING, M.: A probable
acid mucopolysaccharide present in granulation tissue. Proc.
Soc. exp. Biol., 72 : 526-32, 1949.
- IM, M.J.C.; HOOPES, J.E.; SOHN, Y.T.: Enzyme activities in rege-
nerating epithelium during wound healing. I. Acid phosphata-
se. J. Surg. Res., 12 : 402-05, 1972.
- JACKSON, D.S.; FLICKINGER, D.B.; DUNPHY, J.E.: Biochemical studi-
es of connective tissue repair. Ann. N.Y. Acad. Sci., 86 :
943-47, 1960.
- JACKSON, D.S.; BENTLEY, J.P.: On the significance of the extrac-
table collagens. J. biochem. biophys. Cytol., 7 : 37-44 ,
1960.
- JOHNSON, F.R.; Mc MINN, R.M.H.: The association of alkaline phos-
phatase with fibrogenesis. J. Anat., 92 : 544-50, 1958.
- KARKOLA, K.: Enzyme histochemical studies on wound healing in
rat liver. Acta path. et microbiol. scandinav., 228 (sup) :
1-56, 1972.
- KATCHBURIAN, E.; KATCHBURIAN, A.V.; PEARSE, A.G.E.: Histochemis-
try of lysosomal enzymes in developing teeth of albino rats.
J. Anat., 101 : 783-92, 1967.
- KODICEK, E.; LOEWI, G.: The uptake of (³⁵S) sulfate by mucopoly-

- saccharides of granulation tissue. Proc. roy. Soc. B., 144 : 100, 1955.
- KOENIG, C.S.; VIAL, J.D.: A histochemical study of adenosine triphosphatase in the toad gastric mucosa. J. Histochem. Cytochem., 18 : 340-53, 1970.
- KOPRIWA, B.M.; LEBLOND, C.P.: Improvement in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10 : 269 - 84, 1962.
- KROON, D.B.: Phosphatase and the formation of protein-carbohydrate complexes. Acta anat., 15 : 317-28, 1952.
- KULONEN, E.: Research work on the structure and metabolism of collagen. Final report on the project UR-E8 (60)-3. Turku , Kirjapaino Polytipos, 1965.
- LEONARD, E.P.; PROVENZA, D.V.: Histochemical observations on the phosphatase activity of the developing dental primordia in the swiss albino mouse as detected by azo dye and osmium capture methods. Archs. oral Biol., 15 : 635-43, 1970.
- LI, C.Y.; YAM, L.T.; LAM, K.W.: Acid phosphatase isoenzyme in human leukocytes in normal and pathologic conditions. J. Histochem. Cytochem., 18 : 473-81, 1970 a.
- LI, C.Y.; YAM, L.T.; LAM, K.W.: Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes. Demonstration of isoenzyme cell specificity. J. Histochem. Cytochem., 18 : 901-10, 1970 b.
- LILLIE, R.D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. New York, Blakiston, 1954, p. 361.
- LISANTI, V.F.: Hydrolytic enzymes in periodontal tissues. Ann.N.Y. Acad. Sci., 85 : 461-66, 1960.
- LISON, L.: Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1960. v. 1, p 280.

- LOWTHER, D.A.; GREEN, N.M.; CHAPMAN, J.A.: Morphological and chemical studies of collagen formation. II. Metabolic activity of collagen associated with subcellular fractions of guinea-pig granuloma. J. biophys. biochem. Cytol., 10 : 373-80, - 1961.
- MARCHANT, J.: Alkaline phosphatase activity in normal and degenerated peripheral nerves of the rabbit. J. Anat., 83 : 227 - 37, 1949.
- Mc MINN, R.M.H.: Tissue repair. New York, Academic Press, 1969 . p. 19.
- MOOG, F., apud GOLD, N.I; GOULD, B.S.: Collagen fiber formation and alkaline phosphatase. Arch. biochem. biophys., 93 :155 -64, 1951.
- MOOG, F. ; WENGER, E.L.: The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity. Amer. J. Anat., 90 : 339-77, 1952.
- MOSS, D.W.: The heterogeneity of human alkaline phosphatase. FEBS Symposium, 18 : 227-39, 1970.
- NISAKA, T.: Experimental pathological studies on some factors acting upon granulation tissue, with special reference to the acid mucopolysaccharides of its ground substance. J. Tokyo Med. Coll., 22 : 207-36, 1964.
- NOBLE, N.L.; WOESSNER, J.F., Jr.; KAO, K.Y.T. ; BOUCEK, R.J.: In vivo synthesis and turnover of collagen. Fed. Proc., 17 : 283-90, 1958.
- NOVELLI, A.; ZINNARI, A.: Inibizione della produzione di fibre - collagene nel granuloma da carragenina nel ratto durante la rigenerazione del fegato dopo parziale epatectomia. Pathologica, 60 : 115-20, 1968.
- OJALA, K.J.: Morphological and histochemical studies on vital re

action of muscle wound in guinea pig. Excerpta Medica, 22 : 387, 1969.

PALADE, G.E.: Intracellular localization of acid phosphatase. A comparative study of biochemical and histochemical methods.- J. exp. Med., 94 : 535-48, 1951.

PALKAMA, A.; RECHARDT, L.: Light and electron microscopic observations on acid phosphatase activity in the adrenal medulla of the rat and mouse. Ann. Med. exp. Fenn., 48 : 77-83, - 1970.

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 3. ed. London, Churchill, 1968. v. 1, p. 331. -

PEDERSEN, P.; VIIDIK, A.: Maturation of collagen in healing wounds in young and old rats. Scand. J. plast. reconstr. Surg., 6 : 16-23, 1972.

POELMANN, R.E.; DAEMS, W.T.: Problems associated with the demonstration by lead methods of adenosine triphosphatase activity in resident peritoneal macrophages and exsudate monocytes of the guinea pig. J. Histochem. Cytochem., 21 : 488-98, 1973.

PROCKOP, J.; PETERKOFISKY, B.; UDENFRIEND, S.: Studies on the intracellular localization of collagen synthesis in the intact chick embryo. J. biol. Chem., 237 : 1581-86, 1962.

RAEKALLIO, J.: Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing. Nature, 188 : 234-35, 1960.

RAEKALLIO, J.; LEVONEN, E.: The appearance of esterases in rat skin wounds. Ann. Med. exp. Fenn., 41 : 305-10, 1963 a.

RAEKALLIO, J.; LEVONEN, E.: Adenosine triphosphatase activity of rat skin in early wound healing. Acta path. et microbiol. - scandinav., 58 : 451-56, 1963 b.

RAEKALLIO, J.; LINDFORS, R.; ELFYING, G.; HASTBACKA, J.; PUITTI -
NEN, J. : Histochemical observations on wound healing in denerva
ted and healthy rat skin. Acta path. et microbiol. scandi -
nav., 62 : 53-8, 1964.

RAEKALLIO, J.; MAKKINEN, P.L.: Alkaline phosphatase activity in
the initial phase of fracture healing. Acta path. et micro-
biol. scandinav., 75 : 415-22, 1969.

ROBERTSON, W. van B.; DUNIHUE, F.W.; NOVIKOFF, A.B.: The metabo-
lism of connective tissue: absence of alkaline phosphatase -
in collagen fibres during formation. Br. J. exp. Path., 31:
545-49, 1950.

ROSS, R.: Synthesis and secretion of collagen by fibroblasts in
healing wounds, apud The use of radioautography in investiga
ting protein synthesis; New York, Academic Press, 1965. pp.
273-92.

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

ROSS, R.; BENDITT, E.P.: Wound healing and collagen formation.V.
Quantitative electron microscope radioautographic observati-
ons of proline-H³ utilization by fibroblasts. J. Cell Biol.
27 : 83-106, 1965.

ROSTOCK, P., apud CHVAPIL, M.: Physiology of connective tissue .
London, Butterworths, 1967, p. 258.

SAKAMOTO, Y.: Histochemical studies on the healing of experimen-
tal wounds in rats and guinea pigs. J. Osaka Univ. dent. -
Sch., 4 : 643-59, 1959.

SANDBERG, N.: Experimental studies on wound healing. From the -
Institute of Physiology and the Department of Surgery, Uni -
versity of Lund, Sweden, 1963.

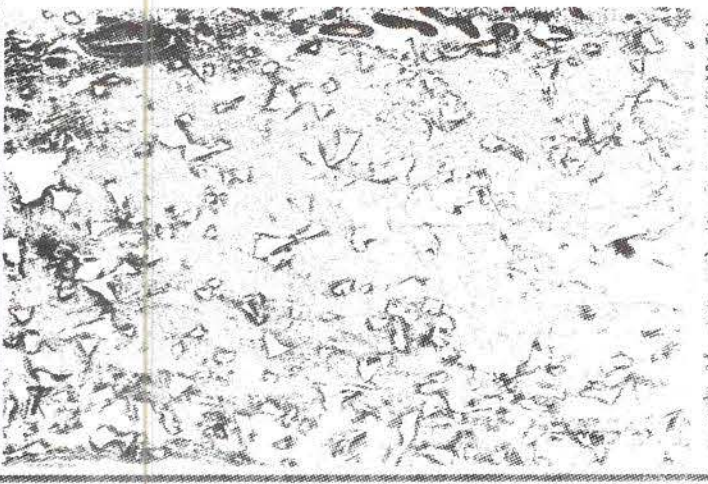
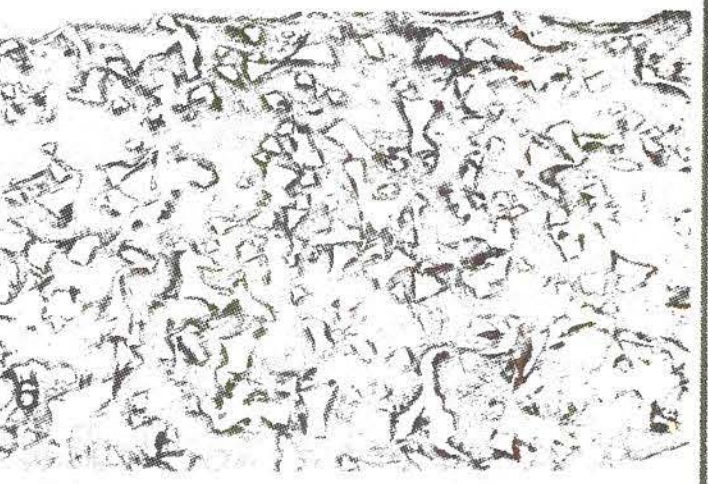
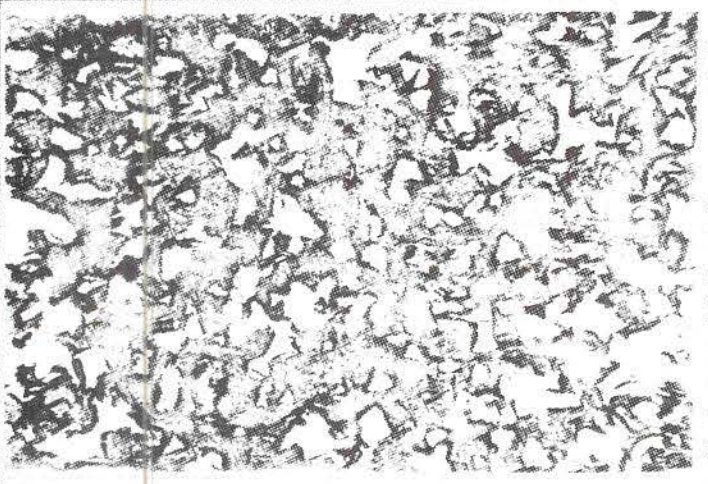
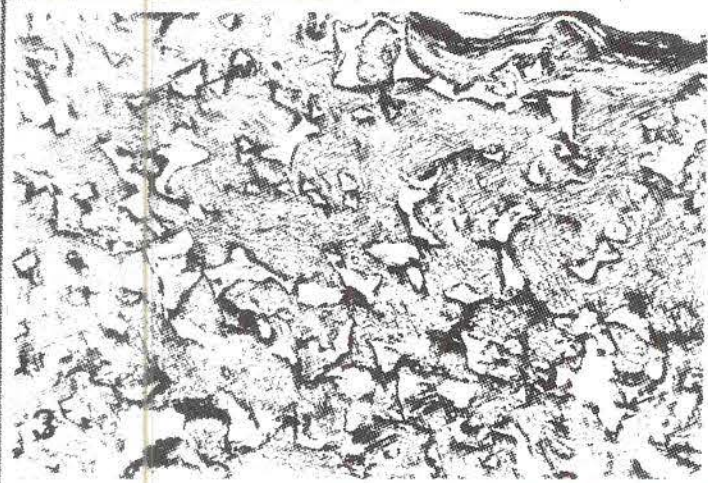
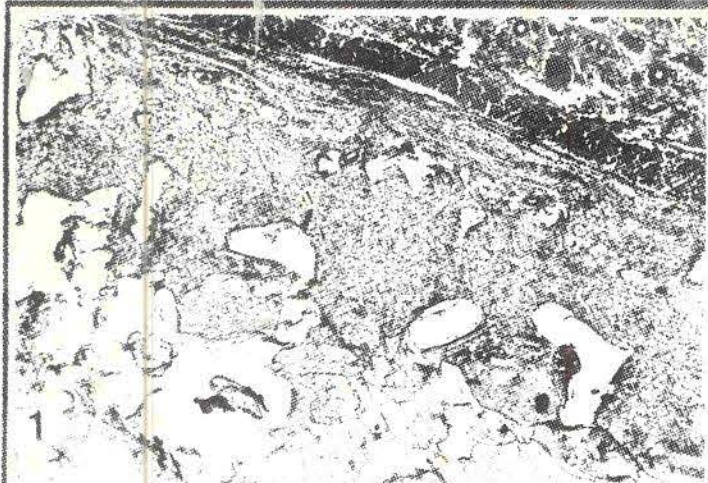
- SASAKI, M.; FISHMAN, W.H.: Dual ultrastructural localization of acid phosphatase in mouse kidney tubule cells. J. Histochem. Cytochem., 21 : 653-60, 1973.
- SCHILLING, J.A.; JOEL, W.; SHURLEY, H.M.: Wound healing: a comparative study of the histochemical changes in granulation tissue contained in stainless steel wire mesh and polyvinyl sponge cylinders. Surgery, 46 : 702-10, 1959.
- SELYE, H.; CUNNINGTON, J.; SOMOGYI, A.; CÔTÉ, G.: Acceleration and inhibition of wound healing by topical treatment with different types of inflammatory irritants. Amer. J. Surg., 117 : 610-5, 1969.
- SILVERMAN, S. Jr.; KEARNS, G.: Ultrastructural localization of acid phosphatase in human buccal epithelium. Archs. oral Biol., 15 : 169-77, 1970.
- SLACK, H.G.B.: Connective tissue growth stimulated by carrageenin. Biochem. J., 65 : 459-64, 1957.
- STEIN, O.; WOLMAN, M.: A histochemical study of wound healing in scorbutic guinea pigs. Br. J. exp. Path., 39 : 418-23, 1958.
- TAKEUCHI, J.; TANOUE, M., apud PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, Theoretical and Applied, 3. ed. London, Churchill, 1968.v.1, p. 728.
- TODO, H.: Healing mechanisms of tooth extraction wounds in rats. II. Histochemical observations on hydrolytic and oxydative enzymes in tooth extraction wounds in the rat. Archs. oral Biol., 13 : 1429-43, 1968.
- UHER, J.: Die mukopolysaccharide bei der wundheilung. Zbl.allg. Path., 107, 228-33, 1965.
- VALDRIGHI, L.: Estudo histoquímico e estrutural dos mucopolissacarídeos ácidos nas gengivites exsudativo-vasculares e inflamatórias. Tese de Doutorado, Piracicaba, 1968, p.61.

- VALDRIGHI, L.: Morphological and histochemical observations of the normal human gingiva. Acta anat., 81 : 448-61, 1972.
- VAN DER PLOEG, M.: Quantitative cytophotometry of alkaline phosphatase in leukocytes and calibration of this enzyme activity in biochemical units. Acta Histochem., 12 (sup.), 131, 1972.
- VIDAL, B.C.: Sobre a organização dos mucopolissacarídeos ácidos em tendões calcaneares de cobaia (Cavia porcellus L.). Tese de Livre-Docencia, Piracicaba, 1964, p. 47.
- VIDAL, B.C.: Macromolecular disorientation in detached tendons. Protoplasma, 62 : 121-32, 1966.
- VINOGRADOV, V.V.: Mucopolysaccharide histochemistry in the healing of skin wounds. Excerpta Medica, 20 : 5, 1967.
- VIZIOLI, M.R.: Alterações dentinárias em dentes humanos cariados. Tese de Doutorado, Piracicaba, 1968, p. 58.
- VIZIOLI, M.R.: Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. Acta anat., 80 : 73-81, 1971.
- VIZIOLI, M.R.: Dynamics of fibrillar components in rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 85 : 368-77, 1973.
- VIZIOLI, M.R.; BOZZO, L.; VALDRIGHI, L.: Alkaline phosphatase activity and the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 83 : 60-9, 1972.
- WACHSTEIN, M.; MEISEL, E., apud PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, Theoretical and Applied, 3. ed., London, Churchill, 1968. pp. 717-25.
- WOESSNER, J.F. Jr.; BOUCEK, R.J.: Connective tissue development in subcutaneously implanted polyvinyl sponge. Arch. biochem. biophys., 93 : 95-109, 1961.

LEGENDAS DAS FOTOMICROGRAFIAS

a) Hematoxilina-eosina

- Fig. 1 - Tecido de Granulação, 5 dias. Observe-se o tecido altamente celularizado, neo-formação vascular, proliferando apenas na periferia, junto à capsula fibrosa. 12X.
- Fig. 2 - Tecido de Granulação de 10 dias de evolução. Note-se que o centro da esponja ainda não foi preenchido pelo tecido em desenvolvimento. Incipiente formação de feixes colâgenos podem ser vistos no tecido ainda altamente celularizado. 12X.
- Fig. 3 - 15 dias de evolução. O tecido começa a se tornar fibrosado, embora continue apresentando grande número de células. Observe-se que os feixes colâgenos tem ainda - aparência frouxa. 12X.
- Fig. 4 - 20 dias de evolução do tecido. A celularidade diminui, e os feixes colâgenos tornam-se mais compactos. Todos os espaços deixados pela esponja são preenchidos. 12X.
- Fig. 5 - Tecido de Granulação, 25 dias pós implantação. A celularidade diminuiu bastante, e a colagenização do tecido é completada. Os espaços da esponja começam a diminuir de volume. 12X.
- Fig. 6 - 30 dias de desenvolvimento. O tecido se torna bem compacto, diminuindo cada vez mais os espaços deixados pela esponja. 12X.
- Fig. 7 - 35 dias de evolução do tecido. Note-se o alto grau de fibrosamento e a notável diminuição dos espaços da esponja. 12X.
- Fig. 8 - Tecido de Granulação aos 40 dias de desenvolvimento, totalmente fibrosado e caminhando para um processo de cicatrização. Os espaços da esponja foram reduzidos a um mínimo. 12X.



b) Radioautografia (lâminas coradas pela hematoxilina eosina)

Fig. 9 - Tecido de Granulação aos 5 dias. Note-se a ativa incorporação da prolina ^3H pelos fibroblastos. 120X.

Fig. 10 - 10 dias de evolução. A incorporação do isótopo pelos fibroblastos aumenta, aumentando também o número de células fibrogenéticas em atividade. 120X.

Fig. 11 - Aos 15 dias, a síntese de colágeno atinge seu ponto máximo, podendo ser observada a grande atividade fibroblástica. 120X.

Fig. 12 - 20 dias de evolução do tecido. A atividade de síntese continua semelhante àquela dos 15 dias, e a síntese de colágeno prossegue ativa. 120X.

Fig. 13 - Tecido de Granulação de 25 dias. Observe-se a notável queda da atividade de síntese proteica pelas células especializadas. 120X.

Figs. 14,15 e 16 - Tecidos de Granulação respectivamente de 30 , 35 e 40 dias, pós-implantação. A atividade de síntese de colágeno decresce uniformemente, - atingindo o mínimo aos 40 dias.120X

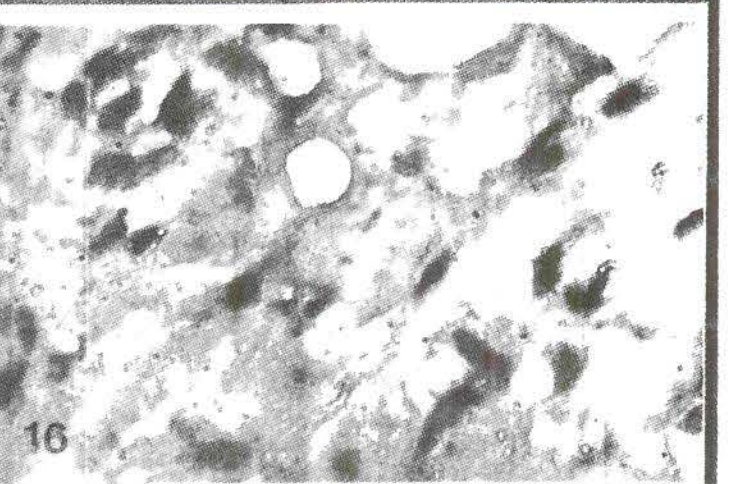
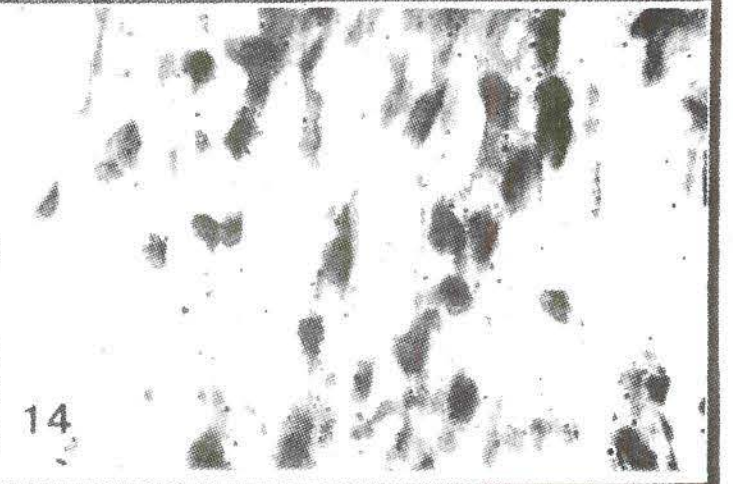
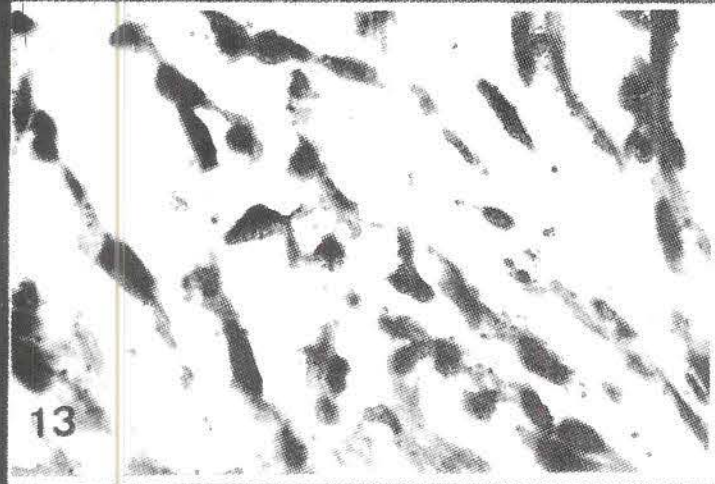
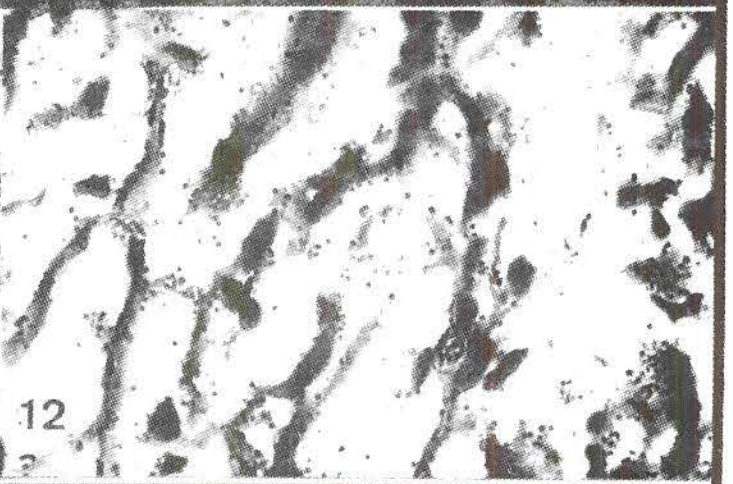
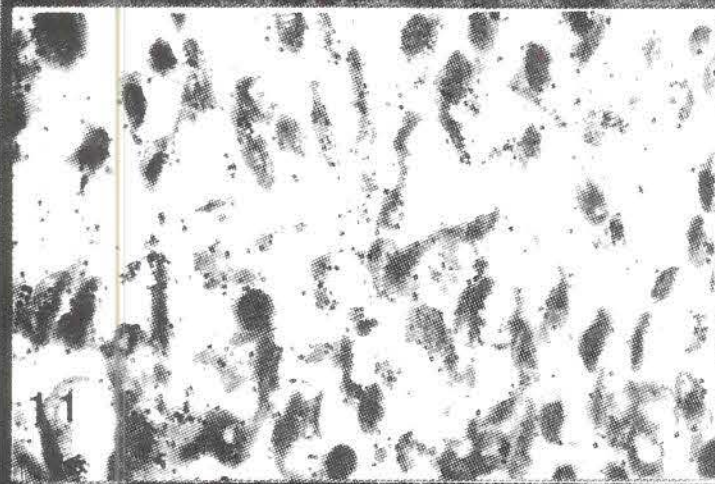
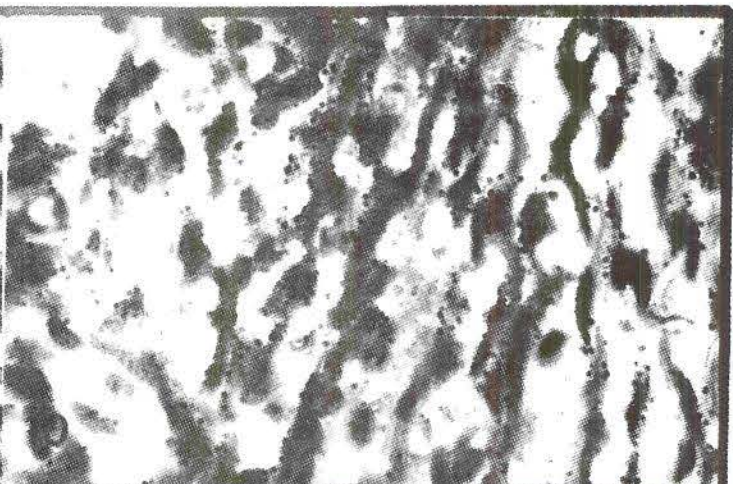
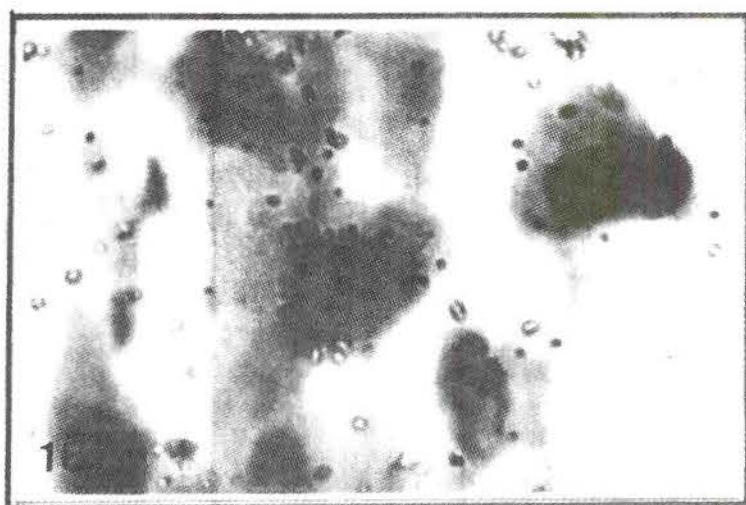
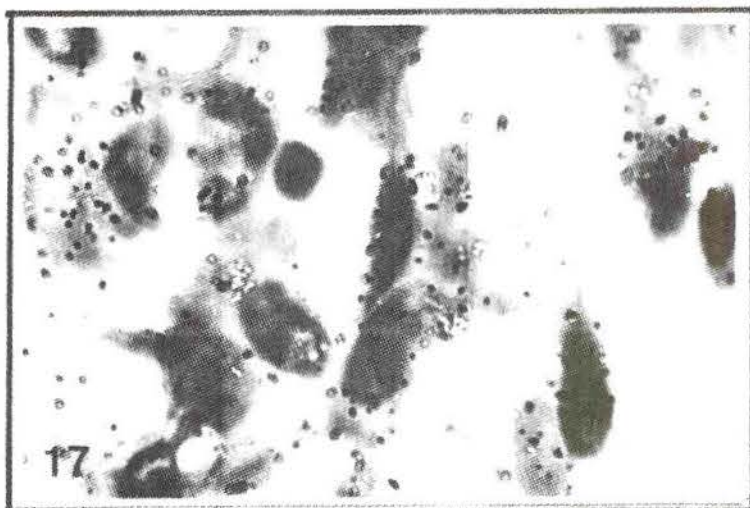


Fig. 17 - Fibroblasto (seta) mostrando a grande atividade de síntese, aos 15 dias de evolução. 300X. -

Fig. 18 - Angioblasto (seta) em evidente atividade de síntese -
aos 15 dias de evolução do tecido. 300X.



c) Fosfatase alcalina

Fig. 19 - 5 dias, mostrando atividades enzimática presente nas -
células do exsudato inflamatório e rede de fibrina.
12X.

Fig. 20 - 10 dias de evolução. Note-se a intensa reação positiva
observada nas fibras colágenas em proliferação na meta
de superior da fotomicrografia. Fibroblastos e células
inflamatórias também mostram reação positiva. A rede -
de fibrina já foi reabsorvida. 12X.

Fig. 21 - Tecido de Granulação aos 15 dias. Note-se a intensa -
reação positiva das fibras colágenas principalmente -
nos locais de agregação (seta). Macrófagos e outras cé
lulas exibem também atividade . 12X.

Fig. 22 - 20 dias de evolução do tecido. Grande atividade da fos
fatase alcalina ao nível de fibras colágenas e células
proliferantes. 12X.

Fig. 23,24,25 e 26 - Tecidos de Granulação aos 25,30,35 e 40 -
dias. Note-se a queda quase total da atividade enzimá
tica nas fibras . Apenas grupos de macrófagos exibem -
atividade marcada (setas) 12X.

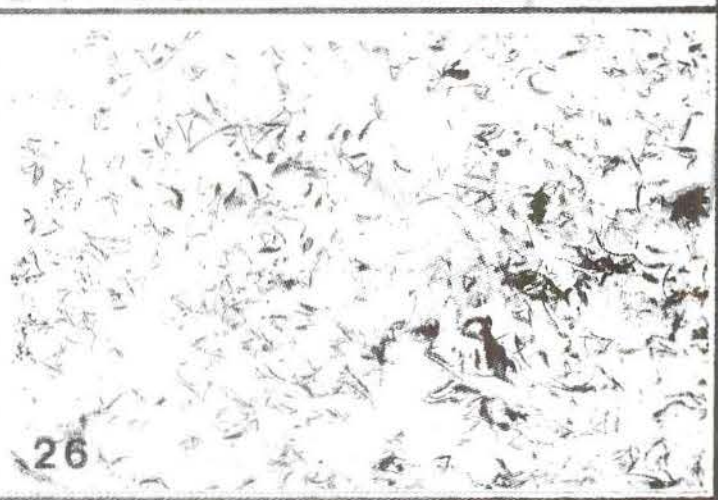
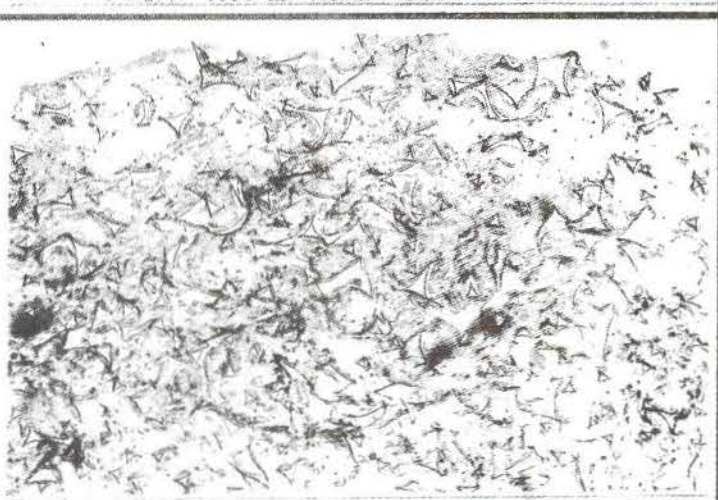
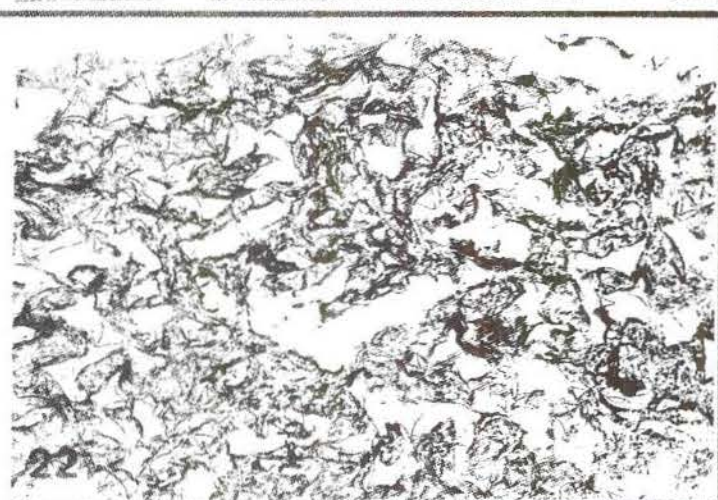
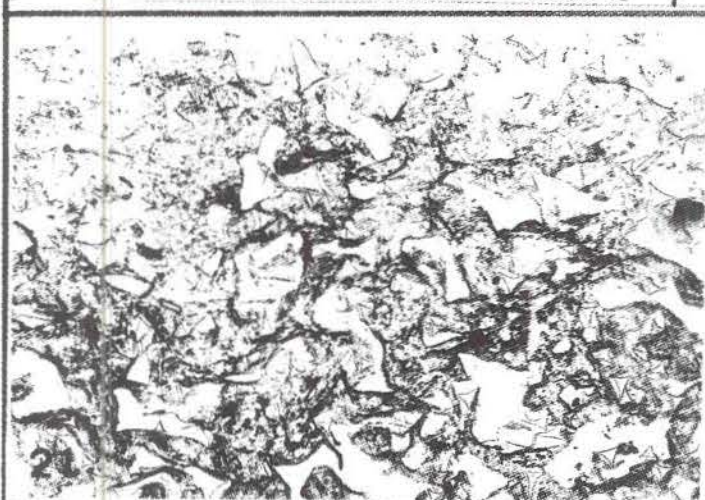
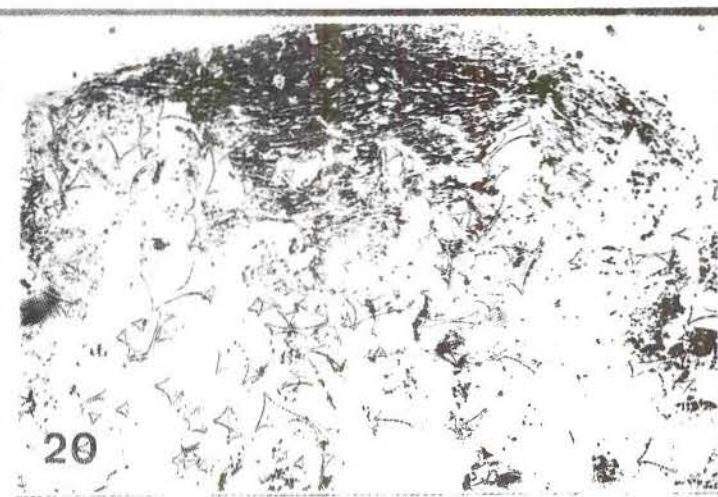
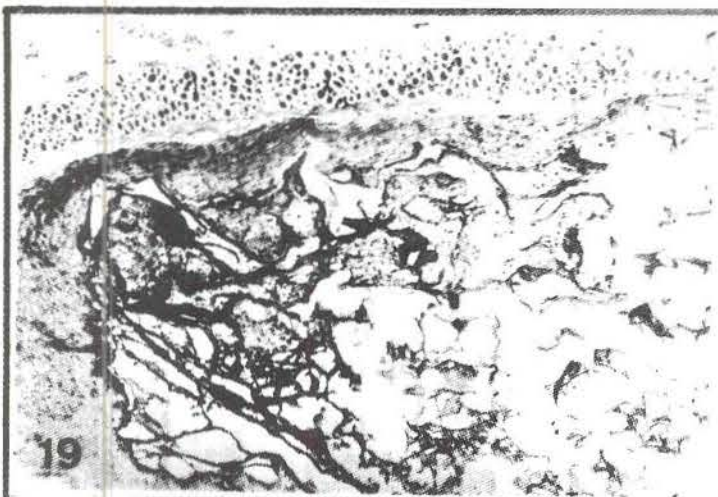
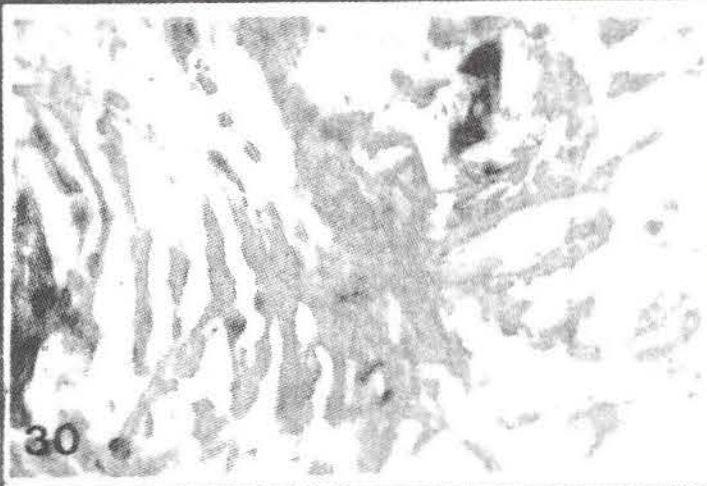
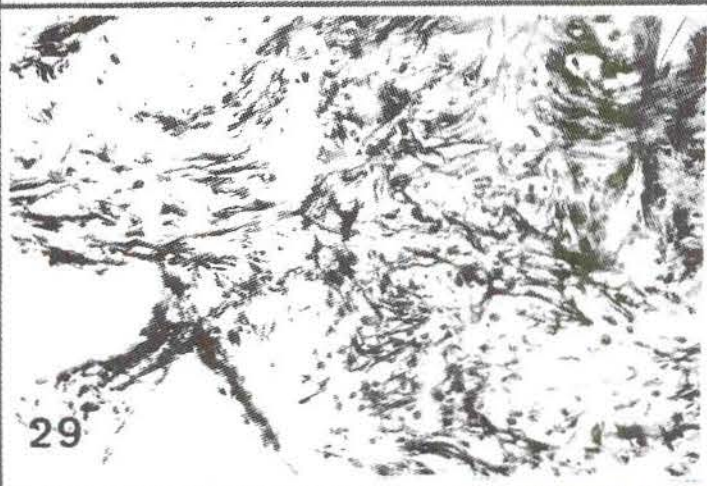
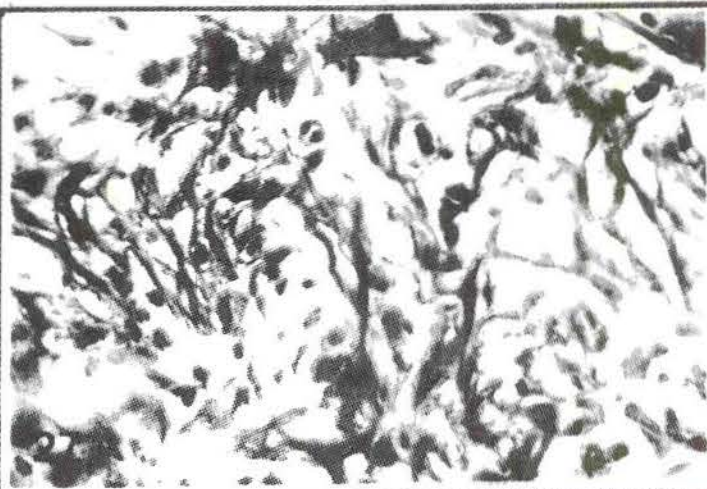


Fig. 27 - Tecido de Granulação aos 10 dias. Note-se intensa reação positiva nos feixes em formação e nos fibroblastos. 160X.

Fig. 28 - 15 dias de evolução. Observe-se a intensa atividade a nível de feixes de colágeno e nas paredes dos vasos neo-formados (seta). 250X.

Fig. 29 - Tecido de Granulação aos 20 dias . A reação positiva à fosfatase alcalina permanece nos locais já apontados. 63X.

Fig. 30 - Tecido de Granulação aos 25 dias. Note-se a queda total da reação positiva nos feixes de colágeno e nas células do tecido. 160X.



d) Fosfatase ácida

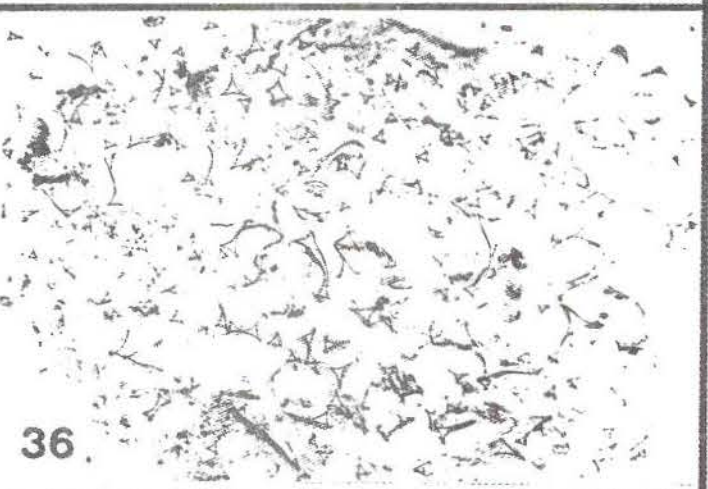
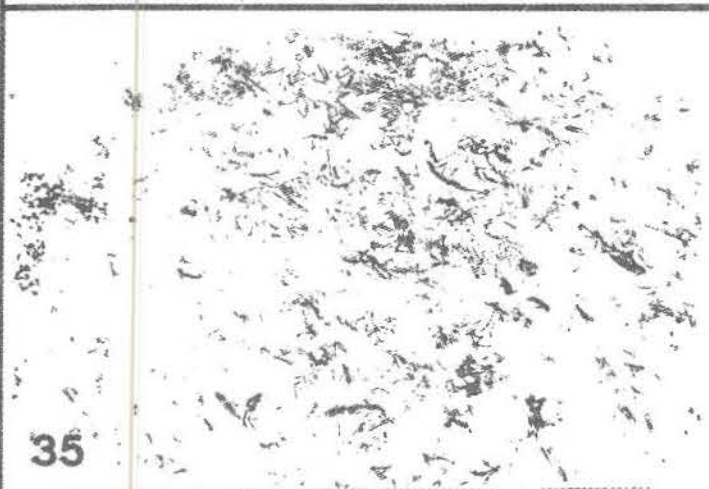
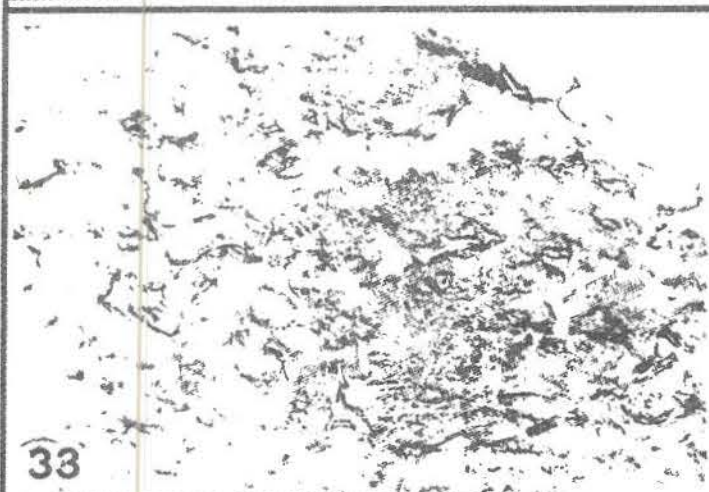
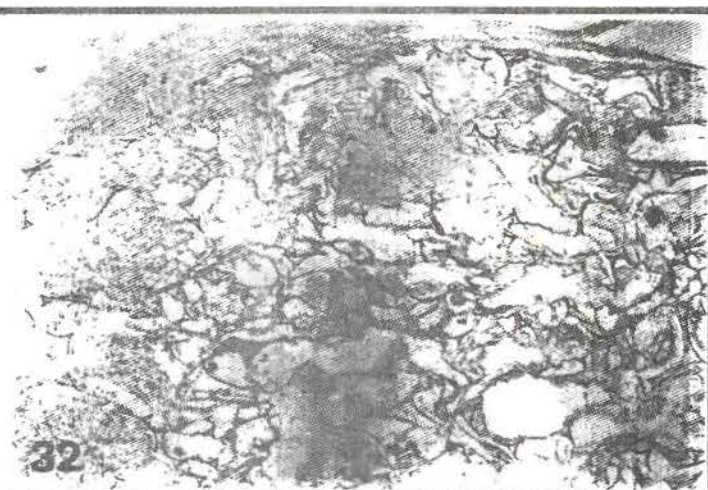
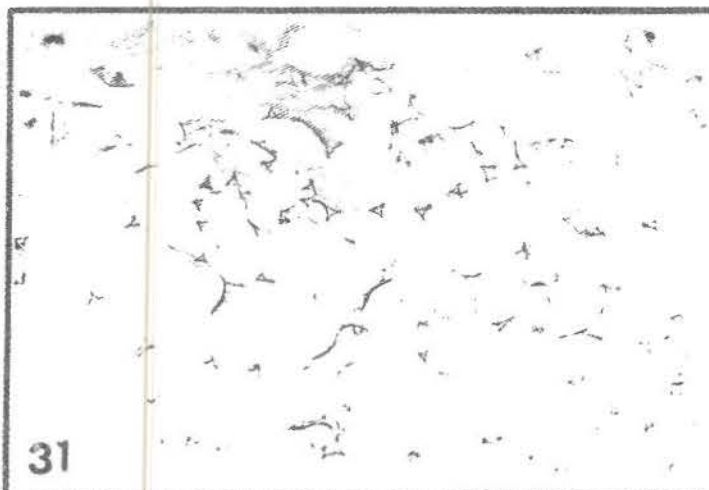
Fig. 31 - 5 dias de evolução. Ausência absoluta de reação positiva à fosfatase ácida. 12X.

Fig. 32 - 10 dias. Continua a ausência da reação à atividade enzimática. 12X.

Fig. 33 - 15 dias de desenvolvimento. Note-se a reação positiva aos Grupos de macrófagos (seta), únicas estruturas a apresentar positividade. 12X.

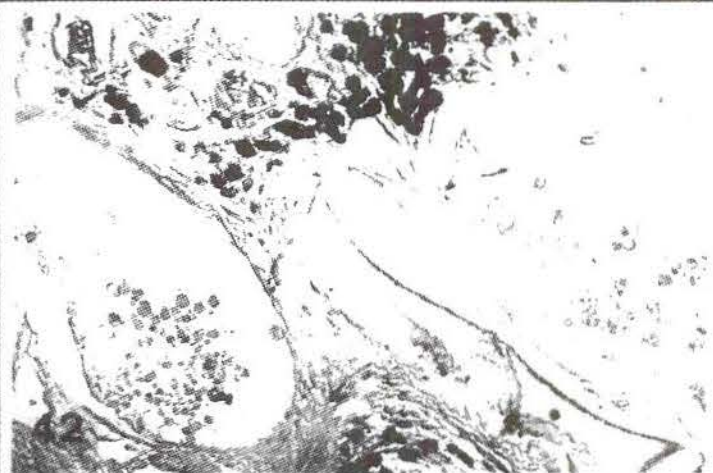
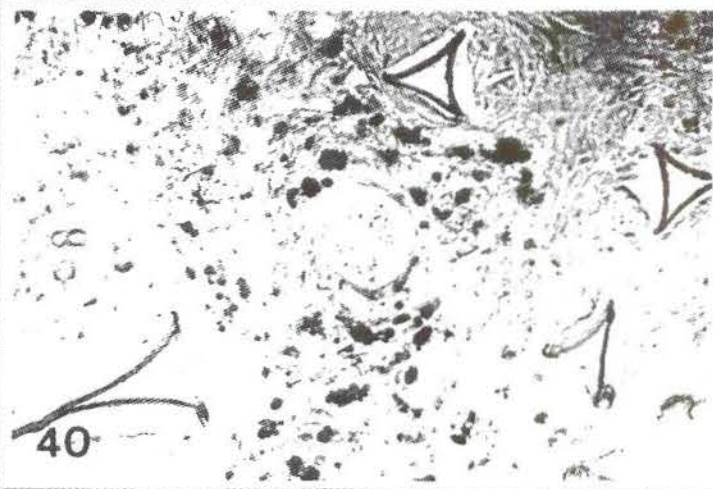
Fig. 34 - Tecido de Granulação, 20 dias. A reação positiva continua a limitar-se aos grupos de macrófagos. 12X.

Figs. 35,36,37 e 38 - Tecidos de Granulação aos 25,30,35 e 40 dias. O aspecto permanece inalterável, semelhante aos 15 e 20 dias. 12X.



Figuras 39,40,41 e 42

Estas figuras referem-se a um aspecto ampliado dos macrófagos reativos à atividade da -
fosfatase ácida . Observe-se que todas as demais estruturas do tecido (paredes de vasos,
fibras colágenas, fibroblastos e hemácias) -
permanecem não reativos.



e) ATPase

Fig. 43 - Tecido aos 5 dias. Ausência absoluta de reação à ATPase 12X.

Fig.44 - 10 dias de evolução . Reação intensa à ATPase, nos capilares em neo-formação e células do tecido. 12X.

Fig.45 - Tecido de Granulação aos 15 dias. A atividade da ATPase atinge o máximo, nas paredes vasculares neoformados e nos fibroblastos. Começa a haver uma aparente difusão da atividade enzimática. 12X.

Fig.46 - Tecido aos 20 dias. A atividade da ATPase começa a declinar, com a difusão aumentando. 12X.

Fig.47 - 25 dias de desenvolvimento. A redução da atividade enzimática é evidente. Também a difusão aparente diminui. 12X.

Figs. 48,49 e 50 - Queda drástica da atividade da ATPase. Apenas os fibroblastos do tecido exibem atividade. 12X.

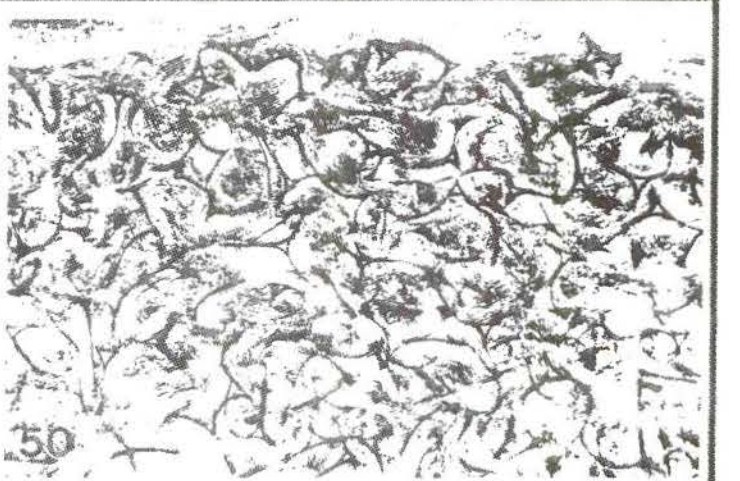
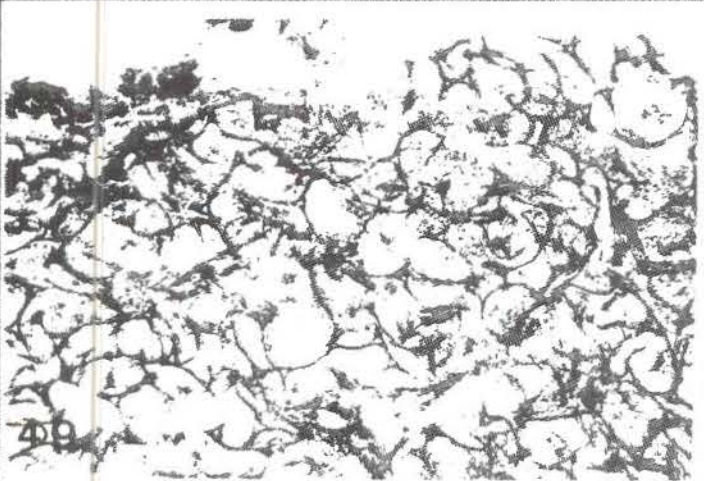
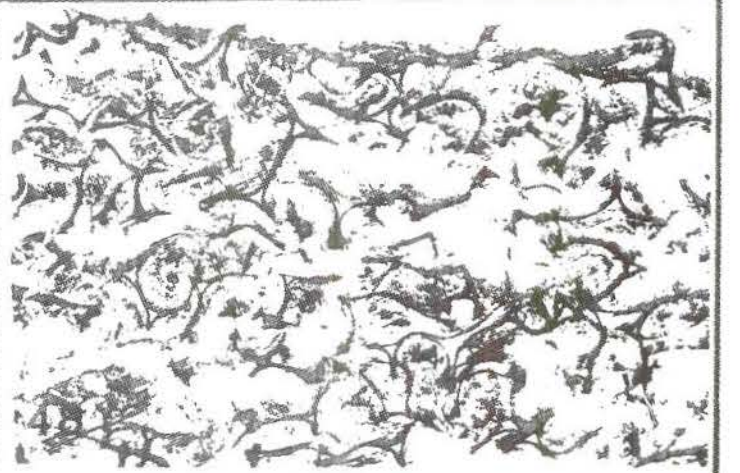
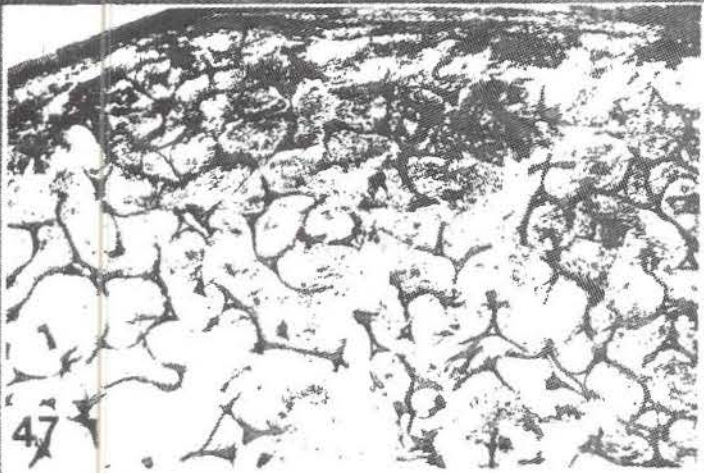
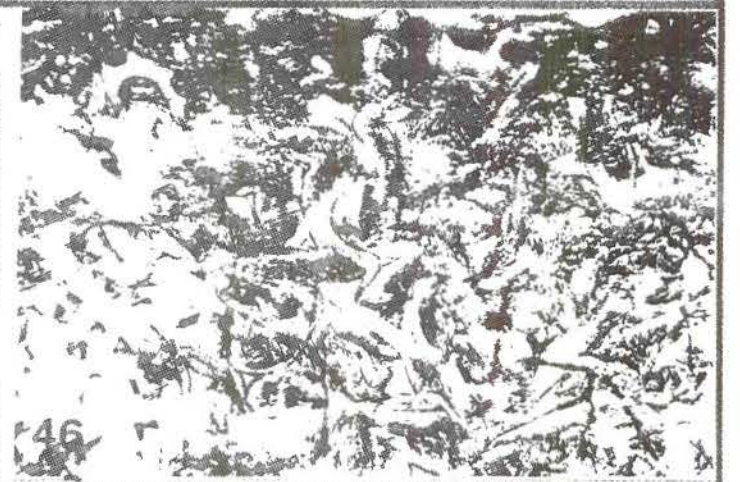
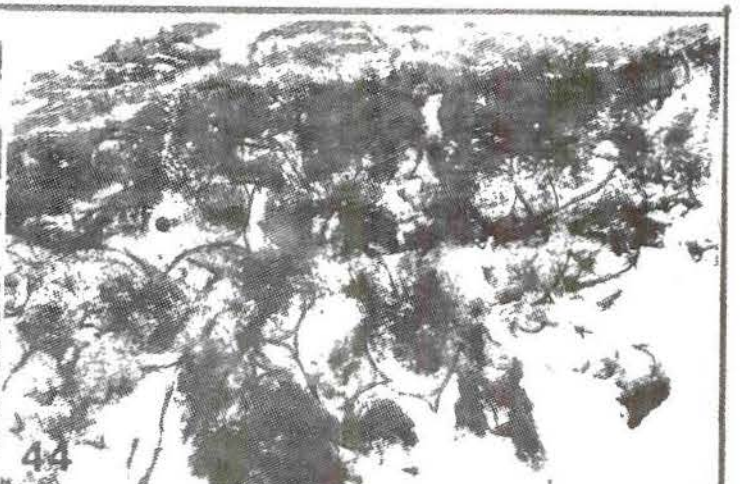
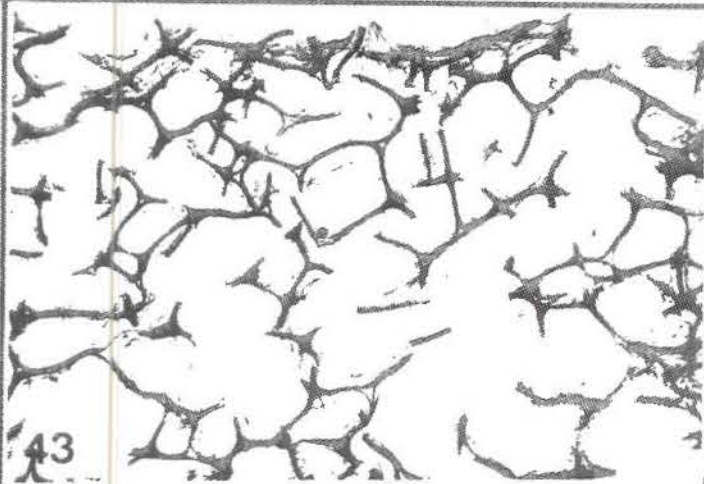
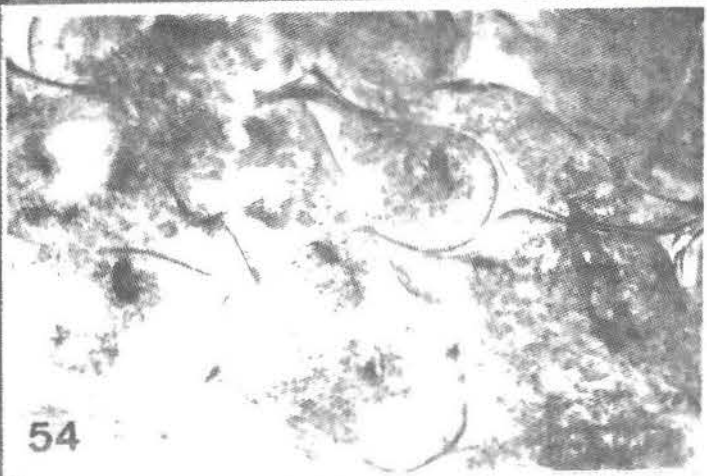
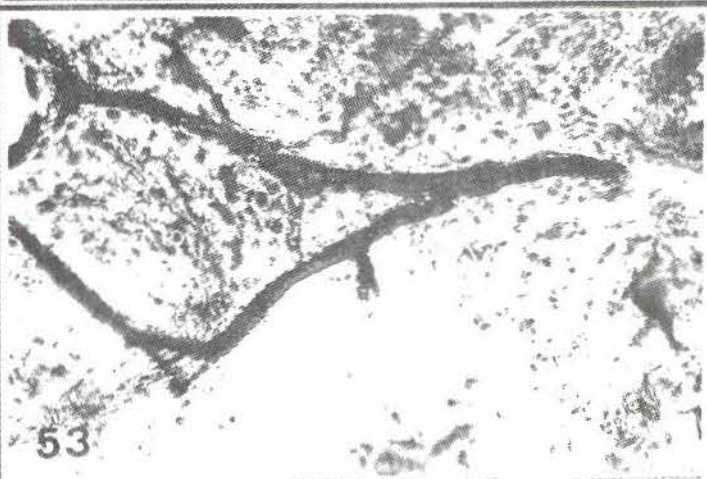


Fig.51 - Atividade da ATPase no tecido de 10 dias. Note-se a rede capilar intensamente positiva, bem como os fibroblastos do tecido. 63X.

Fig.52 - Vaso neo-formado no tecido de 15 dias, mostrando intensa atividade da ATPase nas paredes. Os fibroblastos exibem também positividade à reação. 250X.

Fig.53 - Tecido aos 25 dias. Um vaso capilar exibe queda diástolica da atividade da ATPase em suas paredes, o mesmo sucedendo com as células do tecido. 80X.

Fig.54 - Aos 30 dias, a atividade da ATPase, tanto nos capilares como nos fibroblastos reduz-se ao mínimo. 63X.



f) 5'-nucleotidase

Fig. 55 - Tecido aos 5 dias de desenvolvimento. Existe já reação positiva no tecido, principalmente nas paredes vasculares e núcleos de células proliferantes. A difusão aparente da reação à 5'-nucleotidase é bastante grande. 12X.

Fig. 56 - 10 dias de evolução do tecido. A reação positiva à 5'-nucleotidase pode ser melhor observada nas paredes dos vasos em neo-formação (seta) e nas células em proliferação. 12X.

Fig. 57 - Aos 15 dias, a reação à 5'-nucleotidase é bastante intensa, com grande difusão da atividade (aparente). 12X.

Fig. 58 - 20 dias de evolução. A reação, embora intensa, começa a diminuir. 12X .

Fig. 59 - 25 dias. A queda da reação continua evidente . A difusão diminui, e a reação começa a limitar-se às células. 12X.

Fig. 60,61 e 62 - Aos 30,35 e 40 dias, a reação à 5'-nucleotidase diminuiu progressivamente, exibindo-se, a partir dos 35 dias, apenas nos núcleos celulares, muito fracamente. 12X.

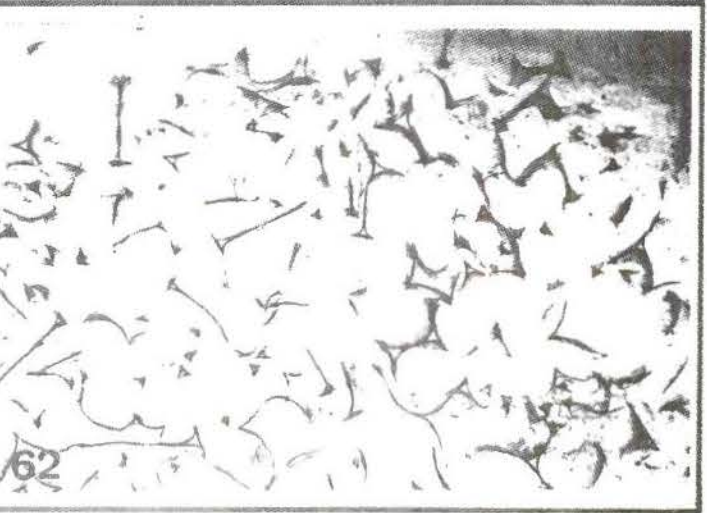
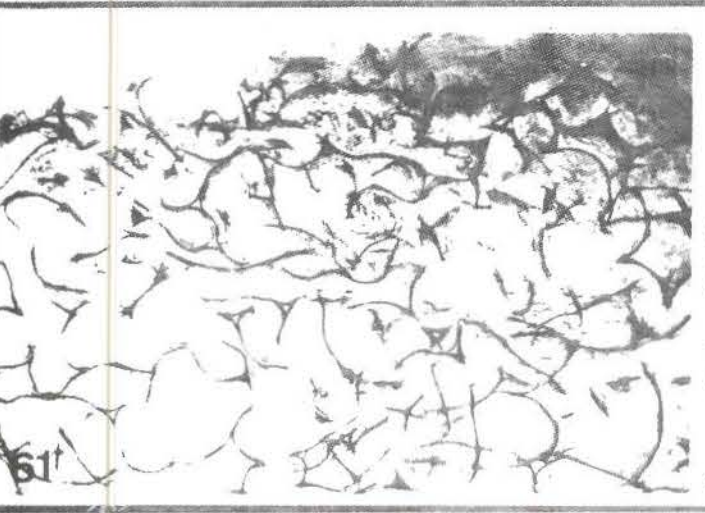
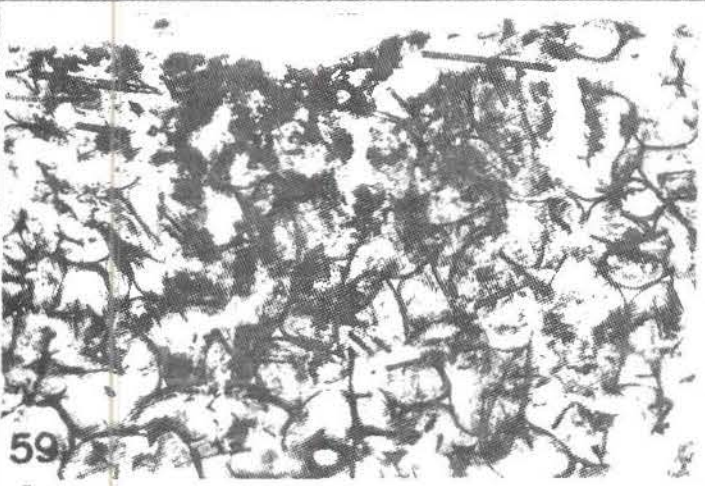
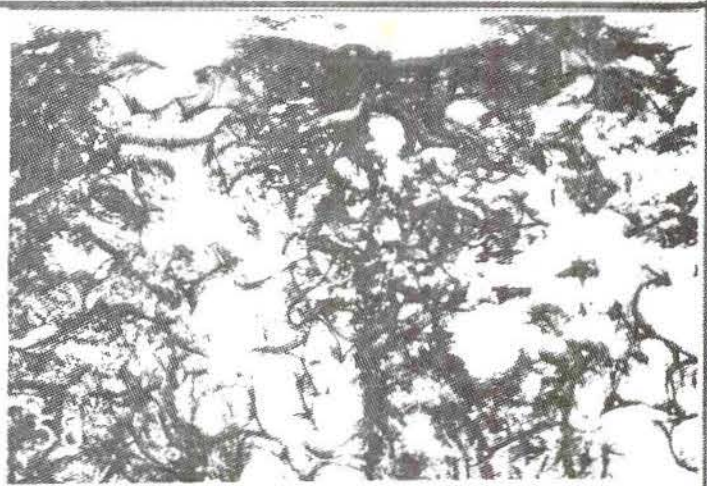
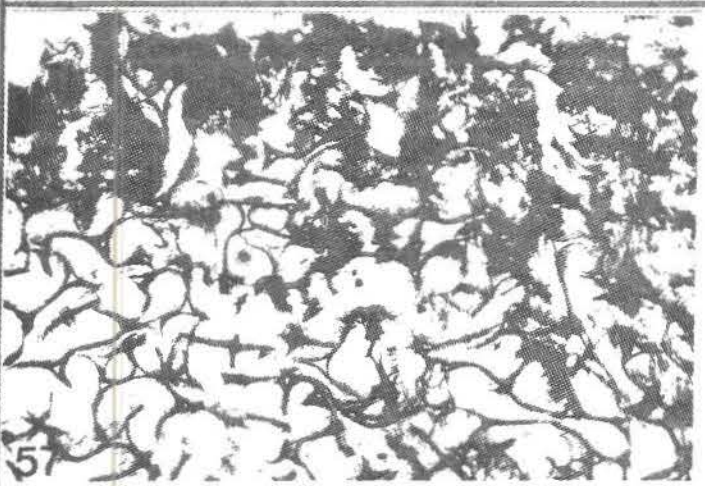
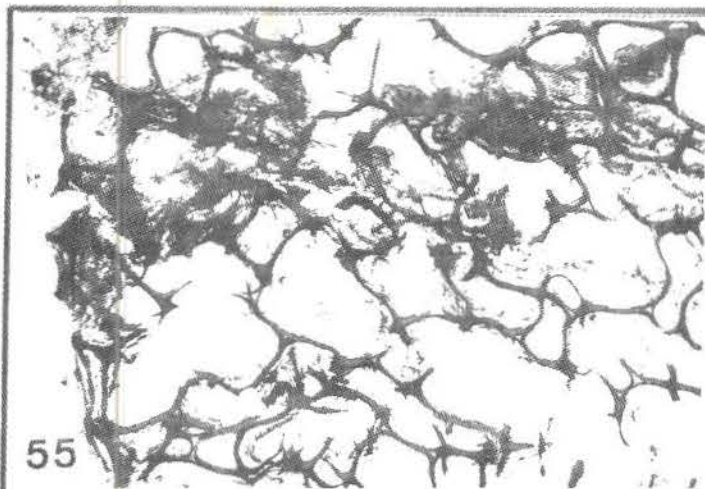
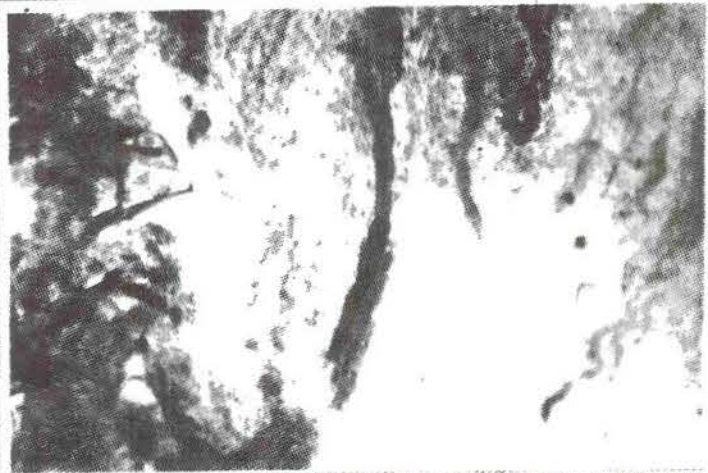
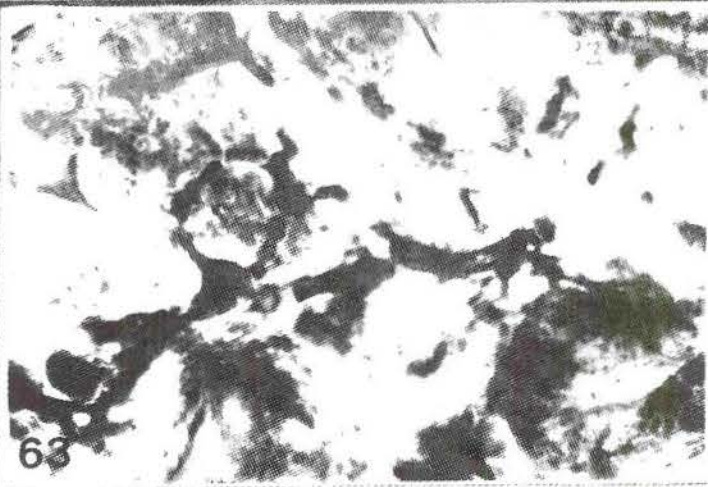


Fig. 63 - Atividade da 5'-nucleotidase aos 10 dias de evolução. Paredes de vasos neo-formados e núcleos celulares exibem positividade à reação . 80X.

Fig. 64 - Intensa atividade enzimática da 5'-nucleotidase nos vasos neo-formados e nos núcleos dos fibroblastos, aos 15 dias de desenvolvimento do tecido. 63X.

Fig. 65 - Núcleos de fibroblastos exibindo intensa reação à 5'-nucleotidase, aos 15 dias. 250X.

Fig. 66 - Aos 30 dias, nota-se moderada atividade do enzima nas paredes vasculares e núcleos celulares. 80X.



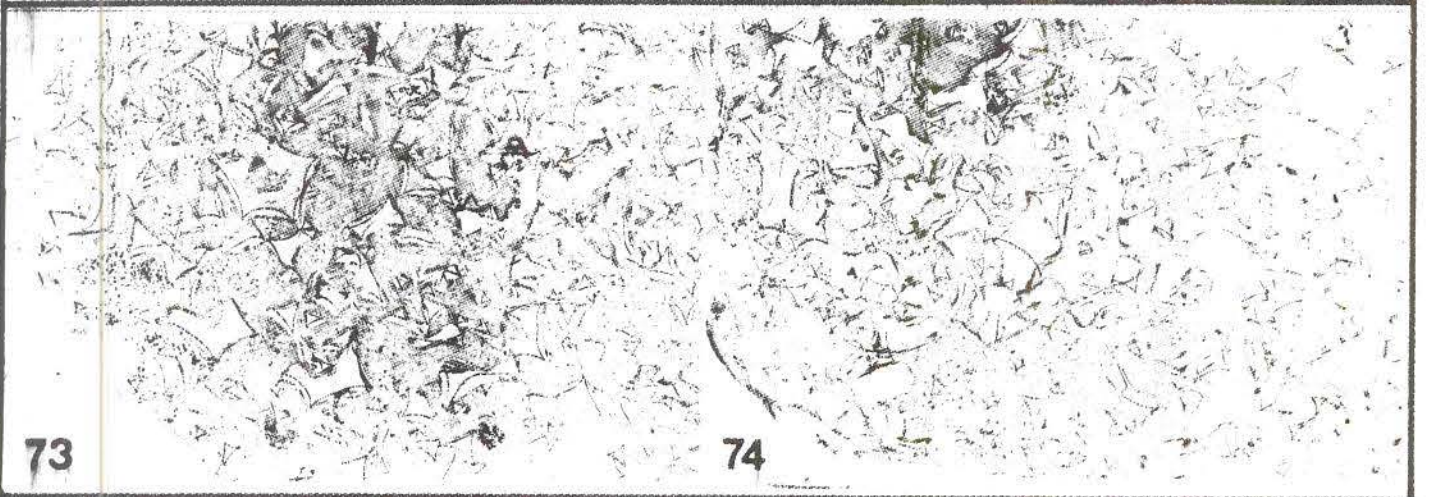
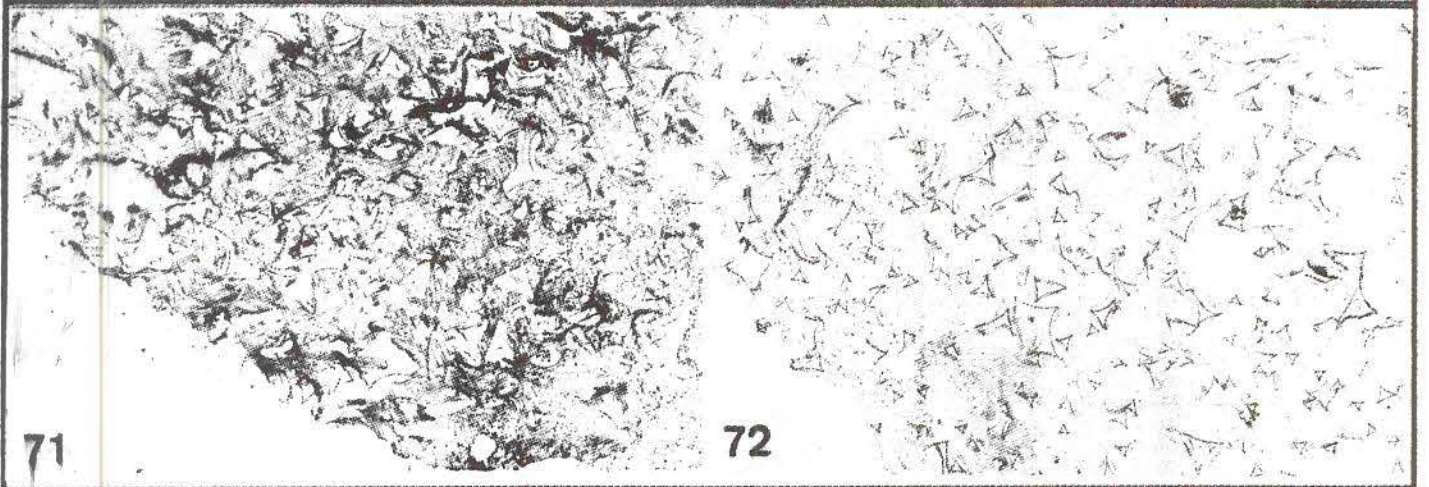
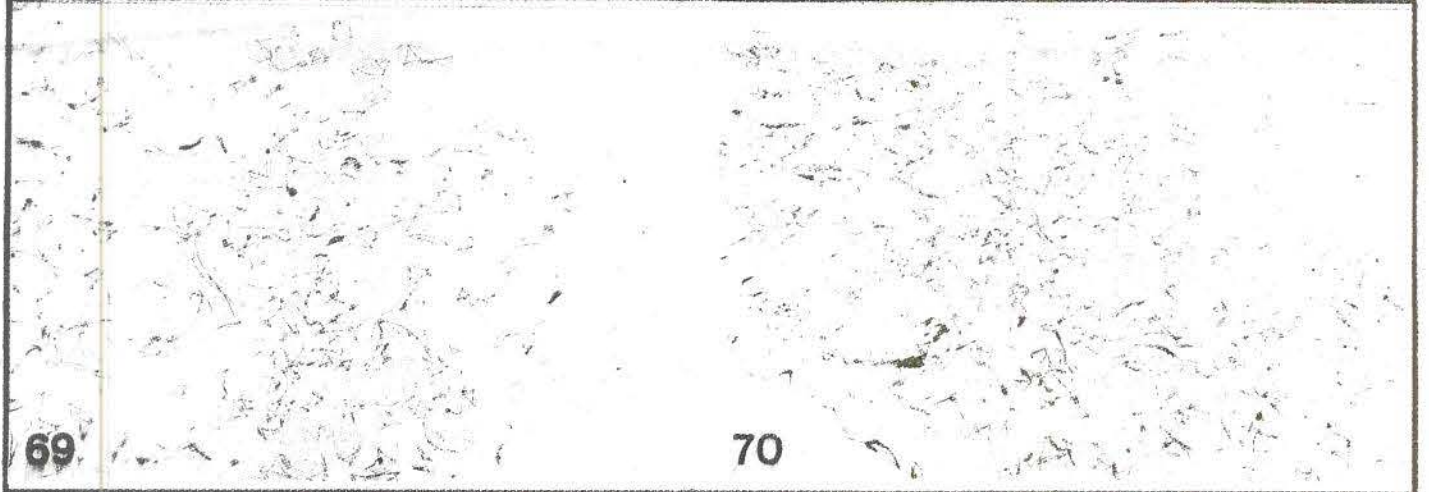
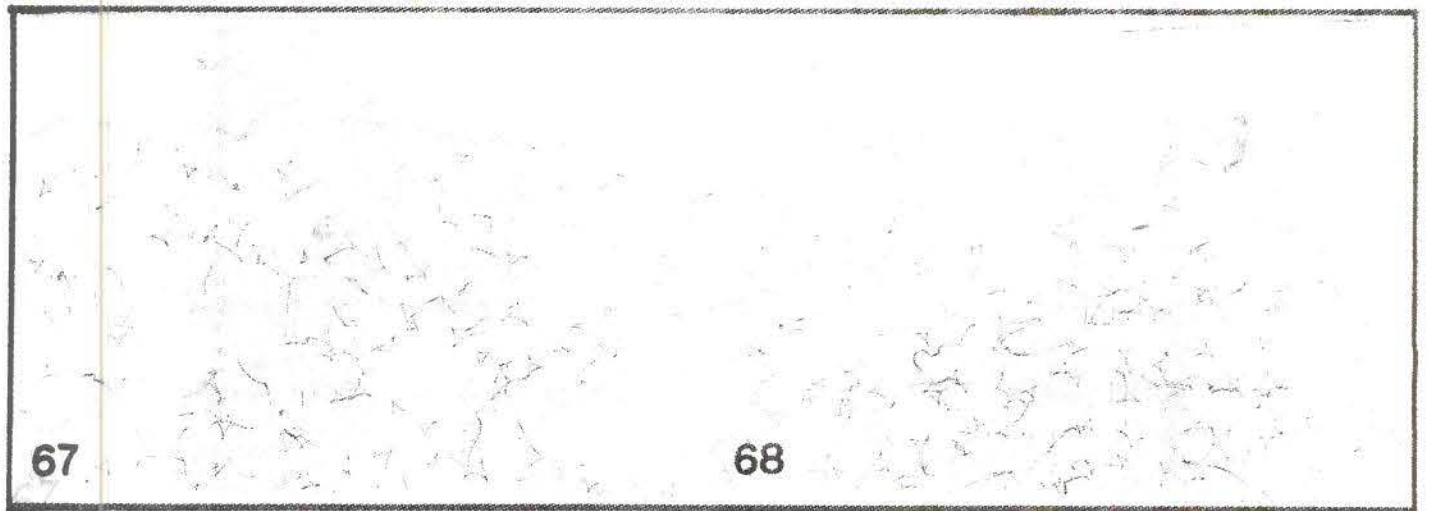
g) Glucose-6-fosfatase

Fig.67 - 5 dias de evolução. Ausência absoluta de reação positiva. 12X.

Fig.68 - Aos 10 dias, não existe ainda sinal algum de atividade da glucose-6-fosfatase. 12X.

Fig.69 - Tecido de granulação de 15 dias. Note-se atividade da glucose-6-fosfatase em grupos de macrófagos (seta).12X.

Figs. 70,71,72,73 e 74 - Apenas os macrófagos exibem reação positiva à glucose-6-fosfatase nos dias subsequentes (respectivamente 20,25,30,35 e 40 dias). 12X.



Figuras 75,76,77 e 78.

Estas figuras mostram a atividade relativamente ligeira da glucose-6-fosfatase nos macrófagos do tecido de granulação. 200X.



APÊNDICE

Medidas, obtidas por meio da histofotometria, das lâminas de tecido de granulação nos diferentes dias de evolução estudados (% de luz transmitida = transmitância).

Tecido de granulação de 5 dias:

Lâmina 1 (81,6%)	87,4 - 77,4 - 77,2 - 83,4 - 87,2
	75,4 - 85,8 - 82,5 - 79,0 - 86,8
	76,5 - 78,6 - 81,9 - 91,4 - 72,4
	75,0 - 92,0 - 85,0 - 81,8 - 76,4

Lâmina 2 (81,0%)	85,3 - 79,4 - 71,4 - 83,0 - 85,1
	76,2 - 88,8 - 78,6 - 75,1 - 83,7
	75,5 - 79,1 - 79,0 - 87,3 - 74,4
	78,0 - 93,2 - 87,9 - 80,0 - 79,1

Lâmina 3 (81,3%)	86,1 - 80,2 - 70,3 - 82,7 - 86,6
	74,7 - 84,0 - 80,3 - 73,3 - 89,9
	81,8 - 82,6 - 70,9 - 77,7 - 83,8
	79,1 - 88,5 - 89,2 - 84,5 - 81,7

10 dias:

Lâmina 1 (74,0%)	78,3 - 76,2 - 77,7 - 76,0 - 75,6
	71,4 - 72,0 - 69,1 - 72,8 - 66,8
	76,0 - 79,1 - 72,2 - 75,2 - 74,5
	74,6 - 72,3 - 77,5 - 73,0 - 70,5

Lâmina 2 (73,8%)	76,9 - 77,8 - 79,0 - 76,7 - 78,1
	70,3 - 71,6 - 73,3 - 71,8 - 70,5
	69,6 - 72,3 - 76,8 - 76,7 - 73,0
	71,2 - 72,4 - 75,9 - 74,1 - 69,8

Lâmina 3 (73,8%)	78,7 - 76,2 - 80,2 - 71,0 - 73,9
	71,8 - 70,5 - 72,7 - 74,2 - 72,2
	77,1 - 69,9 - 70,3 - 77,8 - 76,2
	72,6 - 73,9 - 73,7 - 73,6 - 70,8

15 dias:

Lâmina 1 (66,9%)	72,3 - 60,0 - 68,5 - 67,5 - 68,8
	70,8 - 61,0 - 60,7 - 70,5 - 68,7
	72,2 - 63,5 - 70,4 - 67,5 - 73,1
	64,8 - 59,1 - 71,0 - 68,7 - 59,4
Lâmina 2 (65,8%)	70,6 - 67,8 - 63,5 - 62,7 - 69,1
	66,6 - 63,1 - 60,2 - 66,4 - 68,8
	70,3 - 63,2 - 68,9 - 69,3 - 70,8
	62,6 - 60,8 - 67,7 - 65,3 - 60,0
Lâmina 3 (66,2%)	67,4 - 67,1 - 61,8 - 66,2 - 67,9
	67,6 - 64,4 - 61,2 - 65,5 - 69,4
	68,6 - 67,2 - 69,1 - 67,4 - 69,2
	66,8 - 63,7 - 70,2 - 62,7 - 62,2

20 dias:

Lâmina 1 (57,4%)	59,2 - 58,2 - 64,0 - 52,0 - 55,4
	57,4 - 60,6 - 59,7 - 56,4 - 58,3
	55,7 - 56,4 - 55,5 - 57,7 - 57,3
	55,5 - 55,4 - 56,9 - 55,4 - 61,3
Lâmina 2 (56,5%)	60,8 - 59,2 - 60,3 - 56,0 - 53,2
	54,1 - 58,6 - 60,0 - 55,5 - 54,8
	54,9 - 55,7 - 55,0 - 56,2 - 57,3
	54,8 - 56,1 - 56,0 - 54,5 - 58,8
Lâmina 3 (56,5%)	59,3 - 56,3 - 60,3 - 53,2 - 57,8
	55,1 - 58,8 - 58,2 - 54,5 - 56,1
	53,8 - 55,5 - 54,0 - 54,9 - 59,7
	57,8 - 58,1 - 56,7 - 54,1 - 57,4

25 dias:

Lâmina 1 (70,9%)	70,8 - 72,3 - 69,1 - 67,7 - 71,5
	71,7 - 73,0 - 75,0 - 66,9 - 71,5
	67,5 - 74,3 - 70,5 - 71,2 - 70,2
	72,2 - 73,0 - 72,2 - 71,5 - 66,6
Lâmina 2 (70,9%)	72,3 - 71,7 - 72,0 - 68,8 - 70,5
	70,4 - 71,8 - 69,9 - 68,9 - 72,7
	70,0 - 71,3 - 70,5 - 70,8 - 69,8
	72,4 - 73,0 - 72,4 - 70,6 - 69,5
Lâmina 3 (70,9%)	68,7 - 72,0 - 71,8 - 69,9 - 70,4
	67,9 - 73,0 - 71,5 - 70,5 - 72,2
	71,7 - 69,9 - 72,8 - 71,6 - 70,0
	72,8 - 71,1 - 71,3 - 70,0 - 70,2

30 dias:

Lâmina 1 (75,1%)	75,0 - 79,3 - 77,2 - 72,5 - 77,4
	77,0 - 77,7 - 78,0 - 75,1 - 71,4
	78,0 - 71,5 - 75,3 - 78,4 - 70,8
	72,6 - 79,0 - 71,6 - 71,0 - 74,4
Lâmina 2 (75,2%)	71,8 - 76,6 - 78,8 - 74,5 - 79,0
	76,2 - 78,1 - 77,9 - 76,4 - 73,0
	77,7 - 73,3 - 75,6 - 72,7 - 72,9
	76,8 - 78,5 - 70,4 - 71,0 - 72,8
Lâmina 3 (74,3%)	77,6 - 70,8 - 72,3 - 74,5 - 76,1
	79,2 - 73,3 - 70,6 - 71,8 - 75,3
	74,2 - 76,7 - 72,2 - 75,0 - 75,1
	72,4 - 78,6 - 75,3 - 71,1 - 74,0

35 dias:

Lâmina 1 (75,1%)	71,1 - 75,3 - 71,8 - 75,2 - 78,4
	69,7 - 76,6 - 77,1 - 72,7 - 77,4
	79,4 - 73,7 - 78,3 - 74,0 - 69,0
	75,7 - 76,1 - 79,1 - 79,5 - 73,0
Lâmina 2 (75,3%)	74,3 - 75,2 - 78,0 - 79,2 - 76,3
	78,5 - 74,7 - 77,0 - 76,2 - 71,5
	70,8 - 79,1 - 77,1 - 71,3 - 80,1
	70,3 - 72,3 - 71,7 - 74,8 - 78,2
Lâmina 3 (75,3%)	75,7 - 76,2 - 81,3 - 72,8 - 71,0
	75,2 - 74,8 - 71,3 - 75,0 - 76,6
	69,9 - 79,2 - 78,5 - 74,6 - 77,1
	77,2 - 73,6 - 73,9 - 77,8 - 75,9

40 dias:

Lâmina 1 (75,0%)	75,1 - 79,3 - 79,4 - 71,4 - 77,2
	77,0 - 79,7 - 78,9 - 71,1 - 72,4
	76,9 - 70,8 - 76,3 - 77,4 - 71,9
	71,2 - 72,6 - 79,6 - 71,0 - 74,6
Lâmina 2 (75,0%)	76,2 - 79,6 - 80,0 - 73,2 - 76,1
	76,3 - 80,2 - 77,0 - 70,8 - 71,3
	75,8 - 72,0 - 76,4 - 76,2 - 71,0
	73,6 - 71,6 - 76,2 - 71,8 - 75,7
Lâmina 3 (76,2%)	77,8 - 73,4 - 80,3 - 79,9 - 78,6
	72,3 - 76,7 - 79,8 - 77,3 - 74,2
	73,1 - 71,4 - 70,9 - 76,8 - 74,7
	70,8 - 79,9 - 81,2 - 78,6 - 76,3