

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Escola de Engenharia de São Carlos  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Instituto de Química de São Carlos

**ANÁLISE DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS  
ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA: ESTUDO  
EXPERIMENTAL EM RATOS DIABÉTICOS**

**Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação  
Interunidades Bioengenharia - Escola  
de Engenharia de São Carlos /  
Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto / Instituto de Química de São  
Carlos, da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Bioengenharia.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Nilton Mazzer**

**Ribeirão Preto**

2002

**Ficha catalográfica preparada pela seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC - USP**

**Carvalho, Paulo de Tarso Camillo de**  
**Análise da Cicatrização de Lesões Cutâneas Através da**  
**Espectrofotometria: Estudo Experimental em Ratos**  
**Diabéticos.**  
**Paulo de Tarso Camillo de Carvalho – São Carlos, 2002.**  
**72 p. : il. ; 30cm**

**Dissertação (Mestrado) – Área Interunidades em**  
**Bioengenharia da EESC/FMRP/IQSC – Universidade de São**  
**Paulo, 2002.**  
**Orientador: Prof. Dr. Mazzer, Nilton.**

**1. Cicatrização 2. Diabetes experimental. 3.**  
**Espectrofotometria.**

**A Deus**

**“Ainda que eu falasse línguas, as dos anjos e dos homens, sem amor eu nada seria”.**

**Aos meus pais pelo esforço, exemplo e por se fazerem presente em todos momentos da minha vida.**

**A minha “neném” pela paciência, ajuda, carinho e principalmente por sua persistência.**

**AMO VOCÊS.**

## **Agradecimentos**

**Ao professor e amigo Dr. Nilton Mazzer, pela confiança, exemplo, e principalmente pela paciência.**

**A UNIDERP na pessoa do magnífico Reitor Professor Pedro Chaves dos Santos Filho, pelo apoio, incentivo e por acreditar na educação.**

**A Dr. Iandara Schettert Silva e ao Dr. João Ricardo, pela valiosa colaboração.**

**Aos acadêmicos de iniciação científica do curso de Fisioterapia UNIDERP João Fábio, Tâmara e João Valdivino, pelo auxílio durante a experimentação.**

**Aos professores Ms. Reinaldo Bazzoni e Dr. Celso Correia de Souza pela ajuda na análise estatística.**

**As colegas Maria Inês e Sandra pelo incentivo e correção gramatical.**

**Ao Dr. Takita médico patologista que propiciou a aquisição das imagens.**

**Aos vários amigos da Bioengenharia principalmente, Vanessa Monte Raso e o irmãozinho Dyjalma.**

**Ao Núcleo de Projetos Especiais da UNIDERP pelo apoio e colaboração.**

**A todos os funcionários da Bioengenharia aqui representados pelas secretárias Janete dos Santos e Terezinha de Moraes.**

**Meus sinceros agradecimentos.**

# Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	v
Lista de Símbolos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	4
.	
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1 Processo de Reparo.....	5
2.1.1 Fase de Inflamação.....	6
2.1.2 Fase da Formação de Tecido de Granulação com Depósito de Matriz.....	10
2.1.3 Extracelular.....	17
Maturação e Remodelagem.....	
2.2 Diabetes Mellitus.....	21
2.2.1 Drogas Hiperglicêmicas.....	23
2.2.2 Diabetes e a Reparação Tecidual.....	24
3. Material e Método.....	27
3.1 Animais de Experimentação.....	27
3.2 Grupos Experimentais.....	27
3.3 Indução ao Diabetes Aloxiânico.....	28

<b>3.4 Produção das Feridas</b>	<b>29</b>
Cutâneas.....	
<b>3.5 Procedimentos</b>	<b>30</b>
Histológicos.....	
<b>3.6 Análise</b>	<b>30</b>
Morfométrica.....	
<b>3.7 Análise</b>	<b>32</b>
Estatística.....	
<b>4. Resultados.....</b>	<b>39</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>57</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>67</b>
Apêndice.....	



# Lista de Figuras

1. Figura 01 - Diagrama mostrando o local das lesões na região dorsal do animal.....	29
2. Figura 02 - Indução ao diabetes, através de injeção intravenosa de aloxana (veia dorsal do pênis).....	33
3. Figura 03 - Tricotomia e medida prévia através de um paquímetro	33
4. Figura 04 - Execução da ferida através de bisturi nº 19.....	34
5. Figura 05 - Retirada do tecido.....	34
6. Figura 06 - Controle da glicemia sangüínea através do Glucometer	35
7. Figura 07 - Aquisição de imagem, para análise no programa IMAGELAB.....	36
.	
8. Figura 08 – Representação da tela de captura do programa IMAGELAB.....	36
.	
9. Figura 09 - Representação da tela do programa IMAGELAB, análise do espectro da cor azul para quantificação do colágeno.....	37
10. Figura 10 - Representação da tela do programa IMAGELAB, análise da variância do espectro de azul para fibras colágenas.....	37
11. Figura 11 - Representação da tela do programa IMAGELAB, contagem de macrófagos, lâmina de imunohistoquímica HAM 56.....	38
12. Figura 12 - Representação da planilha de cálculo do programa IMAGELAB.....	38
.	
13. Figura 13 - Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos - 3 dias	41

.....	
14. Figura 14 - Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos - 7 dias.....	42
15. Figura 15 - Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos -14 dias.....	43
16. Figura 16 - Gráfico comparativo das médias de colágeno entre os dias.....	45
.	
17. Figura 17 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar a escassez de fibras (C ) grupo 1 ( animais diabéticos ) 3 dias Tricrômico de Masson 200X.....	46
18. Figura 18 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas , observar fibras em fase de organização ( A) grupo 2 ( animais não diabéticos ) 3 dias Tricrômico de Masson 200X.....	46
19. Figura 19 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar o arranjo das fibras colágenas (A) grupo 1 ( animais diabéticos ) 7 dias Tricrômico de Masson 200X.....	47
20. Figura 20 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar a organização das fibras colágenas (C) e a proliferação endotelial (Vs) grupo 2 ( animais não diabéticos ) 7 dias Tricrômico de Masson.....	47
21. Figura 21 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas com características mais densas e células linfoplasmocitárias (Lp) grupo 1 ( animais diabéticos ) 14 dias Tricrômico de Masson 200X.....	48
22. Figura 22 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas (C ); e vasos sanguíneos (Vs) grupo 2 ( animais não	

diabéticos ) 14 dias Tricrômico de Masson 200X.....	48
23. Figura 23 - Gráfico comparativo da média de macrófagos entre os grupos - 3 dias.....	49
24. Figura 24 - Gráfico comparativo da média de macrófagos entre os grupos - 7 dias.....	50
25. Figura 25 - Gráfico comparativo da média de macrófagos entre os grupos - 14 dias.....	51
26. Figura 26 - Gráfico comparativo das médias de macrófagos entre os dias.....	52
.	
27. Figura 27 - Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro( M ), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 1 ( animais diabéticos) 3 dias aumento de 200X.....	54
28. Figura 28 - Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 (animais não diabéticos ) 3 dias aumento de 200X ....	54
29. Figura 29 - Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 (animais não diabéticos ) 7 dias aumento de 200X ...	55
30. Figura 30 - Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 1 ( animais diabéticos) 7dias aumento de 200X .....	55
31. Figura 31 - Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56, grupo 1 ( animais diabéticos) 14 dias aumento de 200X.....	56
32. Figura 32 - Fotomicrografia mostrando diminuição da	

**concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom  
escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 (animais  
não diabéticos )14 dias aumento de 200X**

56

.....

# Lista de Tabelas

1. Tabela 01 - Taxa de variação de peso pré e pós - experimentação.....	39
2. Tabela 02 - Taxa de glicemia dos grupos 1 e 2.....	40
3. Tabela 03 - Média do percentual de fibras colágenas 3 dias após a lesão.....	40
4. Tabela 04 - Média do percentual de fibras colágenas 7 dias após a lesão.....	41
.	
5. Tabela 05 - Média do percentual de fibras colágenas 14 dias após a lesão.....	43
.	
6. Tabela 06 - Percentual total de fibras colágenas.....	44
7. Tabela 07 - Teste "Tukey" para a variável: "Fibras" Grupo 1.....	44
8. Tabela 08 - Teste "Tukey" para a variável: "Fibras" Grupo 2.....	44
9. Tabela 09 - Número de macrófagos: 3 dias após a lesão.....	49
10. Tabela 10 - Número de macrófagos: 7 dias após a lesão.....	50
11. Tabela 11 - Número de macrófagos: 14 dias após a 12. lesão.....	51
Tabela 12 - Percentual total de macrófagos – comparativo entre os dias.....	52
13. Tabela 13 - Teste "Tukey" para a variável: "Macrófagos" Grupo 1.....	53
14. Tabela 14 - Teste "Tukey" para a variável: "Macrófagos" Grupo 2.....	53

# Lista de Abreviaturas e Siglas

1. **ABC - Avidina-biotina peroxidase**
2. **Anti-IgG - Anti-imunoglobulina G**
3. **DAB - Diaminobenzidina**
4. **DM - Diabetes mellitus**
5. **DNA - Ácido desoxirribonucleíco**
6. **EGF - Fator de crescimento epidérmico**
7. **IDDM - Diabetes mellitus insulino-dependente**
8. **IL-6 - Interleucina 6**
9. **LIAS - Laboratório de informática aplicado à saúde**
10. **NIDDM - Diabetes mellitus não insulino-dependente**
11. **PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas**
12. **PMN - Polimorfonucleares**
13. **RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleíco mensageiro**
14. **SST – Solução salina histoquímica tamponada**
15. **TGF- $\beta$ - Fator transformador do crescimento beta**
16. **TNF - Fator de necrose tumoral**
17. **UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**
18. **UNIDERP – Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal**

# Lista de Símbolos

1. IIb/IIIa - Glicoproteína plaquetária
2. pH -Potencial hidrogeniônico
3.  $\beta$ -Beta - ( células  $\beta$ ) = células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans
4.  $\mu\text{m}$  - Micrômetro
5. HE - Hematoxilina-eosina
6.  $\mu\text{l}$  - Micro litros
7.  $\text{H}_2\text{O}_2$ - Peróxido de hidrogênio
8. HO – Hidroxila
9.  $\mu$  - Micra

## RESUMO

CARVALHO, P.T.C. (2001). Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos. Ribeirão Preto, 2001. 84p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O trabalho tem por objetivo desenvolver um protocolo experimental de avaliação da cicatrização de lesões cutâneas em ratos diabéticos (aloxânicos) através da análise do espectro de cor das fibras colágenas e de macrófagos. Considerando que em indivíduos normais, os mecanismos que regulam a cicatrização são bem conhecidos, determinou-se neste estudo verificar os mecanismos que regulam a cicatrização de animais diabéticos. Utilizamos inicialmente 60 ratos Wistar, machos. O diabetes foi induzido por injeção intravenosa (veia dorsal do pênis de Aloxana (2, 4, 5, 6 - Tetraoxypyrimidina; 5 – 6 Dioxyuracila) SIGMA, 0,1ml de solução a cada 100 g. de peso corporal. Para se chegar ao número de 12 ratos diabéticos, foram utilizados 48 ratos, destes 39,58% não desenvolveram a hiperglicemia nos níveis fixados (acima de 250mg/l ), 6,25% morreram por hipoglicemia nas primeiras 24 horas; nas 48 horas seguintes 20,83% % morreram por hiperglicemia, 4,17% morreram durante procedimento anestésico e 4,17% morreram ao longo do experimento. Foi realizada uma lesão no dorso dos animais que foram divididos em 2 grupos com 12 animais cada e receberam a denominação de Grupo 1 Diabético Grupo 2 Não Diabético. As 24 amostras dos tecidos colhidas no 3º, 7º e 14º após a lesão, foram incluídas em parafina e cortadas transversalmente e passaram por dois processos distintos, ou seja, 24 amostras por coloração com *Tricrômico de Masson* e 24 amostras pela técnica imunohistoquímica - anticorpo monoclonal HAM 56. Utilizou-se o software IMAGELAB para a análise morfométrica do percentual de fibras colágenas por densidade de cor e número de macrófagos evidenciados pela imunohistoquímica. Os dados obtidos em relação ao percentual de fibras colágenas e macrófagos foram tratados estatisticamente por testes paramétricos de análise de variância, segundo dois critérios, e confirmados pelo Teste "Tukey" onde se fixou em 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Fixando-se: para ambos  $p < 0,5$ . Concluímos que o protocolo experimental para avaliação da cicatrização de lesões em ratos diabéticos se mostrou eficaz, demonstrando que a cicatrização no grupo de animais diabéticos apresentou-se retardada durante todas as etapas do processo de reparo e que a porcentagem de fibras colágenas e macrófagos pode ser facilmente analisada pelo espectro de cor.

Palavras-chaves: Cicatrização; Diabetes experimental; Espectrofotometria.



---

**ABSTRACT**

**CARVALHO, P.T.C. (2001). Analysis of cutaneous scarring by means of spectrophotometry: Experimental study in diabetic rats. Ribeirão Preto, 2001. 84p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.**

This study aims to develop an experimental evaluation protocol of the healing of skin wounds in diabetic rats (aloxanic) through the analysis of color spectrum of collagenous fibres and macrophage. Considering that the mechanisms regulating scarring in normal individuals are well-known it was determined to verify the mechanisms regulating the scarring in diabetic animals. 60 Wistar male rats were used. Diabetes was induced by means of intravenous injection (dorsal penis vein of Aloxana (2, 4, 5, 6 - Tetraoxypyrimidine; 5 - 6 Dioxyuracila) SIGMA, 0,1 ml of solution per 100g of body weight. In order to reach 12 diabetic rats, 48 rats were used. 39.58% of them did not develop hypoglycemia in the established levels (above 250mg/l), 6.25% died from hypoglycemia within 24 hours; in the following 48 hours, 20.83% died from hypoglycemia, 4,17% died during the anesthetic procedures and 4,17% died along the experiment. In order to follow the study a lesion was performed on the back of the animals which were divided into two groups with 12 animals each and received the following denomination: Group I Diabetic and Group II Non-Diabetic. The 24 tissue samples collected in the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days after the lesion were included in paraffine and transversally cut and suffered two different processes, that means, 24 samples received coloration with *Masson Tricomie* and 24 samples suffered the imunohistochemical technic - HAM 56 monoclonic antibody. The software IMAGELAB was used in the morphometric analysis of the percentage of collagen by density of colour and number of macrophage highlighted by immunehistochemistry The obtained data concerning the percentage of collagenous fibres and the number of macrophage were statistically treated by ANOVA following two criteria and confirmed by Tukey Test where the rejection level of nullity possibility was established to be 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ). It was obtained  $p < 0,5$  for both. We came to the conclusion that the experimental protocol for the evaluation of healing of wounds in diabetic rats has proved efficient, showing that the healing in the group of diabetic animals is slowed down during all the stages of the repairing process; the percentage of collagenous fibres and macrophage can be easily analysed by the colour spectrum.

**Key words: Healing, Diabetes, Experimental, Spectrophotometry**

## 1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo complexo, que tem ao longo dos anos merecido a atenção de pesquisadores, principalmente no que tange a fatores que a retardam ou dificultam. Há quase meio século, diversos pesquisadores vêm estudando os problemas de cicatrização apresentados pelos portadores de diabetes mellitus, principalmente os que acontecem na primeira fase inflamatória que é caracterizada por eventos vasculares e celulares. As falhas mais importantes são as que ocorrem nos estágios iniciais do reparo, levando à acentuação do edema, reduzida proliferação vascular e diminuição dos elementos celulares, tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos.

As alterações desses eventos são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno, além de contribuírem para aumentar os riscos de infecções no paciente diabético. Tendo em vista os agravantes mencionados, atualmente os estudos norteiam-se na busca de uma melhor compreensão dos mecanismos que regulam a cicatrização e o processo de reparo tecidual destes pacientes.

O processo de reparação não é um simples processo linear no qual fatores de crescimento disparam a proliferação celular, e sim uma integração de processos interativos dinâmicos, que envolve mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas. Os eventos celulares e bioquímicos no reparo das feridas

podem ser divididos em três fases: inflamação, fase fibroblástica e maturação e remodelação. Essas fases não são mutuamente excludentes, e sim sobrepostas no tempo (RINGLER, 2000).

As tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local começam muito cedo no processo da inflamação e, no final, resultam em reparo e substituição das células mortas ou danificadas, por células saudáveis.

O estudo da inflamação tem história antiga e rica, intimamente relacionada com as guerras, feridas e infecções. Celsus (30 a.C. – 38 d.C.) descreveu os quatro sinais cardeais: rubor, tumor, calor e dor. John Hunter (1728-1793) compreendia a inflamação como um processo benéfico e de proteção, sem o qual animais e seres humanos não poderiam sobreviver aos seus inimigos. Uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação foi realizada por Julius Cohnheim (1839 –1884), o primeiro pesquisador a descrever a seqüência dos eventos vasculares, que são dilatação, estase do sangue, marginalização e emigração dos leucócitos (MOVAT, 1985)

Podemos definir inflamação como uma reação do tecido vascularizado vivo às agressões. As causas da inflamação podem ser classificadas em hipóxia, agentes físicos, agentes químicos, agentes infecciosos, reações imunológicas, doenças auto-imunes e distúrbios genéticos. Existem quatro componentes principais no processo inflamatório: proteínas plasmáticas, que vazam para o espaço perivascular no local da inflamação, o que justifica o tumor ou tumefação; células teciduais fixas, como os mastócitos, fibroblastos, leucócitos e plaquetas que chegam ao local da inflamação através da corrente sangüínea e em mediadores da reação inflamatória, que

consistem de proteínas, lipídeos ácidos e aminas vasoativas (ROBBINS et al,1996).

Na fase fibroblástica, com a ativação de macrófagos na ferida e com a elaboração de fatores de crescimento específicos, a matriz extracelular pode começar a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. O principal componente de uma cicatriz de tecido conjuntivo maduro é o colágeno. Assim, podemos afirmar que, na ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da ferida e induzidos a sintetizar essa proteína, num processo coletivo conhecido como fibroplasia. A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento. Esse tecido consiste de uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, contendo macrófagos, fibroblastos e vasos recém –formados e exsudativos.(RYAN & MAJNO, 1977)

Durante todo o processo de cicatrização, os macrófagos apresentam um papel relevante, pois têm varias funções. Eles debridam o tecido através da fagocitose e digestão de microorganismos patogênicos, limpando a área de tecido lesado e de neutrófilos efetores, desempenhando um papel crítico para o início da reparação tecidual (NEWMAN et al., 1992).

A maturação e a remodelagem é a fase final da cura de uma ferida. É durante essa fase que a cicatriz da ferida adquire sua máxima resistência. A resistência de uma cicatriz conjuntiva fibrosa pode ser atribuída à deposição de colágeno e remodelagem das fibrilas de colágeno, de modo que sejam formados feixes maiores dessa proteína, com maior número de ligações covalentes transversais entre as fibrilas (RINGLER, 2000).

GRANDINI (1978) realizou um estudo histológico em ratos, dos efeitos do diabetes induzido por pancreatectomia parcial na cicatrização de feridas, e

observou que os animais diabéticos apresentaram retardo na reparação. O retardo foi observado principalmente no processo de diferenciação dos fibroblastos. Conseqüentemente, a maturação do tecido conjuntivo foi acentuadamente diminuída, quando comparada à do grupo-controle.

Assim como GRANDINI, vários autores reportaram-se ao tema. Entre eles, podemos citar os trabalhos de GOODSON & HUNT (1979); SCHNEIR et al. (1979); GARCIA-LEME (1981); BOWERSOX, (1986); CORREA & PIRES (1988; NISHIGAKI (1989); ROSENBERG (1990); FAHEY; SMOLLER; SHIRES (1991; CUTLER et al. (1991) e outros.

Considerando o exposto, que revela a importância dos macrófagos e do colágeno no processo de cicatrização de lesões cutâneas, e a dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos, foi idealizado um estudo experimental comparativo da cicatrização de lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos normais e ratos diabéticos aloxânicos, baseado na avaliação da concentração de fibras colágenas e de macrófagos, através da análise do espectro da cor.

As lâminas histológicas deste experimento foram analisadas pelo software “Sistema de Processamento e Análise de Imagem – Imagelab”, que utiliza recursos computacionais gráficos, permitindo o processamento e o cálculo de vários parâmetros em imagens digitalizadas. Desta forma, nos aliamos às inovações tecnológicas, que a cada dia tornam os trabalhos científicos mais precisos e relevantes, para realizar este estudo.

## 1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo experimental comparativo da cicatrização das lesões cutâneas induzidas

**cirurgicamente em ratos normais e ratos diabéticos (Aloxânico), baseado na avaliação da concentração de fibras colágenas e de macrófagos, através da análise do espectro da cor.**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Processo de Reparo

O processo de reparo existe para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido durante resposta inflamatória e, depois que esta desapareceu, a cura de uma ferida é uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem se suceder numa seqüência apropriada, e o resultado final geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representa o somatório deste processo. Os processos que envolvem o reparo de uma ferida devem ser controlados com precisão, caso contrário, eles podem se descontrolar, com resultados destrutivos. O quelóide, uma cicatriz de tecido conjuntivo exuberante, é um exemplo de controle inadequado do reparo, que ocorre em resposta a um ferimento cutâneo. Nessas circunstâncias, a cicatriz contém excessivas quantidades de colágeno, o que resulta numa projeção tumoriforme, acima da superfície cutânea.

Segundo CLARK (1993), os eventos da cicatrização dos tecidos podem ser divididos em três fases, que não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. Estas fases são nomeadas de inflamação, formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação tecidual.

O grau de isquemia, oxigenação e aporte de fatores angiogênicos de crescimento, que aparecem no início de uma ferida até o fim de sua

remodelação, influenciam na aparência final da cicatriz, ou seja, o processo de reparação une três ocorrências: hemostasia, inflamação e reparação propriamente dita (McKINNEY; CUNNINGHAM 1989).

O processo de cicatrização é caracterizado pelo preenchimento de determinado espaço e selado pela cicatriz. Entretanto, este quadro pode ser alterado pela presença ou ausência de bactérias, tipo de ferida (aberta/ fechada), grau de suprimento sanguíneo, tipo de tecido lesado etc. (MAJNO & JORIS, 1996).

### 2. 1.1 Fase de Inflamação

Inflamação é a resposta do corpo à lesão tecidual. Não importa se os fatores que a causaram sejam térmicos, químicos, traumáticos ou biológicos; na maioria das vezes ocorre uma solução de continuidade da integridade vascular da área lesionada.

A ruptura de vasos sanguíneos leva ao extravasamento de sangue ou apenas à perda de plasma, para o tecido circunjacente. Os eventos iniciais no processo de cura são os direcionados para a prevenção de qualquer perda subsequente de sangue. Os vasos lesados contraem-se, ocorre aderência e agregação das plaquetas no local e, em seguida, a ativação da cascata de coagulação. O resultado é a formação do trombo, que tem dois objetivos: primeiramente, limita a perda de sangue subsequente; em segundo lugar, fornece uma matriz preliminar, que estabelece a base para subsequentes processos de reparo.

As plaquetas extravasadas aderem ao colágeno no espaço perivascular, usando receptores na membrana celular plaquetária específicos para as proteínas da matriz extracelular.



O contato com colágeno fibrilar ativa as plaquetas e, assim, ocorre a indução das proteínas adesivas IIb/IIIa, específicas da membrana plaquetária e da integrina  $\beta$ . As plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos, que contêm fibrinogênio, fibronectina, fator Von Willebrand e trombospondina, assim que se tenham ligado ao colágeno ou a outras proteínas de matriz extracelular. As moléculas adicionais da matriz celular se juntam à massa agregada de plaquetas e fibrina, interagindo com as moléculas de adesão das plaquetas, através da ação da glicoproteína plaquetária IIb/IIIa. As interações estabilizam e fortalecem a nova matriz provisória. O fibrinogênio do plasma, que está escapando da vasculatura lesada, assim como, o fibrinogênio liberado pelas plaquetas, são induzidos a polimerizar através da via extrínseca ou intrínseca da coagulação. O gel extravascular que ocupa provisoriamente a cavidade criada pela ferida inicial é composto de material proveniente do sangue e por uma matriz extracelular fraca, formada por fibrinogênio, fibronectina e fator de von Willebrand. Boa parte dessas substâncias, têm origem nas plaquetas ativadas que estão capturadas no interior do trombo.

Os estímulos necessários para a indução da reação inflamatória aguda são proporcionados pelos eventos subseqüentes à lesão vascular. O fator de Hageman ativado, que é uma molécula do sistema de coagulação derivada do plasma, inicia o sistema das cininas, para a geração da bradicinina, que é um peptídeo ativo. Afora suas propriedades vasoativas, a bradicinina induz a produção de metabólitos araquidônicos que são potentes moléculas proinflamatórias.

O sistema fibrinolítico, que degrada a fibrina, é composto por agentes quimiotáticos para neutrófilos; os componentes do sistema do complemento clivados também participam da indução primária da inflamação, por meio da

produção de anafilatoxinas, que desagregam os mastócitos e fornecem importantes substâncias quimiotáticas para os leucócitos.

Neutrófilos e macrófagos respondem rapidamente a essa nova e abundante fonte de agentes quimiotáticos e estímulos ativadores. A matriz extracelular recém-formada também proporciona um substrato para a subsequente migração dos leucócitos. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a chegar ao local da lesão e sua função é fagocitar e matar qualquer bactéria presente na área.

Em contraste com o papel desempenhado pelos neutrófilos nos processos de reparo, o subsequente influxo de macrófagos até a área da lesão é, isoladamente, o elemento mais crítico na indução dos mecanismos de reparo.

Macrófagos derivados de monócitos começam a acumular-se entre 2 e 5 dias após a lesão, sendo suas funções ajudar os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, debris teciduais, e remover os neutrófilos exauridos. Vale asseverar que os macrófagos liberam diversos fatores de crescimento e citocinas, relevantes na manutenção da reação inflamatória e na iniciação do processo de cura da ferida.

Os sinais responsáveis pela produção de fatores de crescimento pelos macrófagos para o reparo do tecido são exclusivamente governados pelo microambiente local. Com o comprometimento da microvasculatura no local lesado, e com a formação de um trombo avascular, o tecido situado no centro da ferida fica relativamente isquêmico. A presença de neutrófilos e macrófagos ativados nessa área aumenta a demanda metabólica pelo oxigênio. Como consequência, a tensão de oxigênio cai e, assim, o pH aumenta no espaço ocupado pela lesão.

Essa combinação de hipóxia, acidez e concentração de lactato ativa os macrófagos da ferida a enviar sinais de perigo, que se manifestam pela elaboração de fatores de crescimento. Os fatores de crescimento derivados do macrófago são coletivamente responsáveis pela seqüência de alterações que caracterizam a fase seguinte do reparo da ferida.

Dentro da ferida, a tensão de oxigênio está próxima do zero e durante este período observa-se a angiogênese. Este processo pode ser creditado aos macrófagos que migram ao interior da ferida tornando-se anóxicos, o que estimula o crescimento dos capilares (KNIGHTON; SILVER; HUNT, 1981).

Os neutrófilos são fagocitados por macrófagos, que ainda removem o tecido lesado, desbridando-o e o livrando de microorganismos patogênicos (NEWMAN; HENSON.; HENSON 1992).

Quando o neutrófilo infiltra, o acúmulo de monócitos continua estimulado pelos fatores quimiotáticos seletivos de monócitos, que incluem fragmentos de colágeno, elastina e fibronectina, trombina enzimaticamente ativa e TGF- $\beta$ . (HUYBRECHTS-GODIN; PEETERS-JORIS; VAES 1979).

Segundo DYSON (1990), os principais fatores de crescimento ligados à migração e à coordenação dos fibroblastos e macrófagos para a cicatriz são os fatores de crescimento epidermal (EGF), o fator beta de crescimento transformante (TGF- $\beta$  ) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF).

### **2.1.2 Fase da Formação de Tecido de Granulação com Depósito de Matriz Extracelular**

A matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico, com a ativação de macrófagos na ferida e com a elaboração de fatores de crescimento específicos.

O colágeno é o principal componente da cicatriz de tecido conjuntivo maturo. Na ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da ferida e induzidos a sintetizar essa proteína, num processo seletivo conhecido como fibroplasia. Ocorre neovascularização concorrentemente com fibroplasia, de modo que novos capilares brotam dos tecidos viáveis na borda da ferida, migrando até o espaço da ferida. A contração da ferida faz com que suas margens se aproximem mais e, se o tecido original estava revestido por uma superfície epitelial, a reepitelização começa a cobri-la.

O principal problema que afeta a reparação de uma ferida aberta é a perda de substância. O leito da ferida deve ser preenchido muitas vezes e embora o organismo seja capaz de preenchê-la com o tecido de granulação, existe um mecanismo coadjuvante em que suas margens movem-se uma em direção à outra, como se houvesse uma força de tração invisível (PEACOCK, 1984).

A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento, sendo formado por uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos e vasos recém-formados e exsudativos.

O tecido de granulação é um leito denso de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, suportados por uma matriz de fibronectina, colágeno tipos I e II, além de ácido hialurônico (GUIDUGLI-NETO, 1992).

De acordo com GUIDUGLI-NETO (1987), o tecido de granulação começa a ser formado por volta do quarto dia após a lesão e nesta etapa, os novos fibroblastos acumulados misturam-se a neoformações de capilares, dando início ao tecido de granulação.

Os fibroblastos principal componente do tecido de granulação, são células fibrilares alongadas que contêm núcleos hipercromáticos roliços e ovóides, com freqüente figura de mitose, essas células formam feixes ou fascículos. Os novos capilares formam fileiras paralelas, perpendiculares à superfície da ferida. O tecido é edematoso e caracteriza-se por muitos espaços vazios, em decorrência da imaturidade dos novos capilares, que tendem a exsudar fluidos. Quando observadas a olho nu, as superfícies parecem conter muitos grânulos vermelhos, que na verdade são as extremidades rombas das alças dos novos capilares, que avançam

perpendicularmente e em direção à superfície. Tipicamente o tecido tem uma cor vermelho-escura e sangra com muita facilidade.

São vários os fatores responsáveis pela formação do tecido de granulação. Embora os fatores de crescimento desempenhem um papel crucial na migração e diferenciação das células necessárias à formação do tecido de granulação, os macrófagos presentes na ferida e as plaquetas capturadas no trombo são, provavelmente, os principais contribuintes no processo.

A matriz extracelular, formada por constituintes plasmáticos, plaquetas, macrófagos e os fibroblastos que vão chegando, proporciona um meio para a aderência, migração e orientação das células que irão formar o tecido de granulação em desenvolvimento. A natureza anatômica da própria ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação celulares até o espaço ocupado pela ferida.

MONTESANO & ORCI (1988) denominaram “efeitos de vizinhança livre” o fenômeno em que células basais, ao lado do corte, ativadas pela repentina falta de vizinhos, arrastam-se à área desnudada. As células normais possuem controle sobre sua capacidade de proliferação, mediante suas interações com células adjacentes. Por um processo conhecido como inibição de contato, ou seja, por sua íntima associação com seus vizinhos, as células conseguem “pistas ambientais” que favorecem a inibição da atividade mitótica. As células residentes nas margens da ferida perderam os sinais normais de inibição de contato, existentes antes da lesão. Assim, essas células tendem a proliferar na direção do espaço ocupado pela mesma.

Com o crescimento centrípeto dos fibroblastos a partir das margens da ferida, ocorre simultaneamente angiogênese. As células endoteliais no interior dos capilares intactos nas margens da ferida, irrompem através da

membrana basal da parede vascular, mediante a secreção de colagenase e do ativador do plasminogênio. Em seguida, essas células migram na direção do espaço ocupado pela ferida, utilizando como substrato a matriz extracelular ali presente. Essas células migratórias diferenciam-se para formar novos tubos capilares, do que resulta que a maior parte da neovascularização ocorrente na ferida é secundária a diferenciação das células endoteliais migratórias.

Em geral, a proliferação das células endoteliais ocorre apenas no vaso genitor, para a devida substituição das células que migraram. O broto capilar une-se ao capilar genitor, para que se estabeleça o fluxo sanguíneo. Os macrófagos situados na ferida são responsáveis pela elaboração de substância angiogênica e, mais notavelmente, dos fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs). Segundo RUDOLPH & BALLANTYNE (1990), a angiogênese aumenta o necessário para que, em dois ou três dias após a lesão, alguns brotos comecem a aparecer de ponta a ponta.

A neovascularização é essencial nesse estágio, porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY & DUDLEY, 1988).

Uma contínua reconstrução e mudança nos constituintes da matriz extracelular ocorre durante o processo de reparo da ferida. Inicialmente, a matriz estava composta de proteínas derivadas em grande parte das plaquetas e do plasma; com a migração dos macrófagos até a ferida e a subsequente formação de tecido de granulação, os componentes da matriz extracelular são manufaturados pelas células "in situ".

Os fibroblastos depositam grandes quantidades de fibronectina que desempenha uma série de funções, mas atua especificamente como substrato necessário para fixação. Outro componente importante da matriz extracelular

nessa fase é o ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano que enfraquece a fixação das células ao substrato. A combinação desses dois componentes da matriz cria um microambiente eficiente para a movimentação das células, que envolve a contínua fixação, desalojamento e refixação de células à matriz da ferida.

A fibronectina juntamente com o ácido hialurônico são os componentes predominantes da matriz durante as primeiras fases do reparo de uma ferida. À medida que a ferida vai se curando, diminui a concentração do ácido hialurônico e aumenta a concentração dos proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa alteração na composição dos proteoglicanos favorece a fixação e imobilidade das células. Com a cessação do movimento, as células diferenciam-se em fenótipos mais maduros. As células endoteliais maturam e resultam em capilares funcionais para células de revestimento e os fibroblastos dão início à formação do colágeno. À medida que a ferida avança em seu processo de maturação, os proteoglicanos e a fibronectina são cada vez mais substituídos pelo colágeno, o principal componente estrutural da cicatriz.

Os fibroblastos passam por algumas alterações fenotípicas dramáticas, que vão desde as células migratórias, replicativas e imaturas, até verdadeiras fábricas de produção de colágeno. O citoplasma torna-se mais volumoso e contém um abundante retículo endoplasmático rugoso, como se espera de uma célula ativamente engajada na síntese de proteínas.

O colágeno é a proteína mais comumente encontrada em animais, e sua produção envolve diversos eventos pós-translacionais. Cada molécula de colágeno compõe-se de três cadeias polipeptídicas enroladas umas as outras, em forma de hélice.



Os muitos tipos de colágenos encontrados nos tecidos são explicados pela composição bioquímica das cadeias individuais e a combinação dessas cadeias formadoras da molécula de colágeno. Entretanto, cada molécula de colágeno é similar, visto que as cadeias peptídicas possuem o aminoácido glicina em cada terceira posição, com prolina e lisina freqüentemente nas outras posições.

As cadeias polipeptídicas são manufaturadas no citoplasma do fibroblasto, especificamente nos ribossomas. A partir dessas organelas, as cadeias passam para as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, onde as três cadeias são montadas numa hélice.

Um aspecto crítico para a formação da hélice é a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina, para a formação, respectivamente, de hidroxiprolina e hidroxilisina. A hidroxilação da lisina e da prolina torna-se necessária para a estabilidade da hélice, e subsequente liberação da célula.

Em seguida à formação da hélice, a molécula passa a ser conhecida como procolágeno. Uma vez fora da célula, a molécula de procolágeno é clivada de seus domínios não helicais terminais por procolágeno-peptidases específicas, sendo então designada tropocolágeno. Sem os domínios não helicais terminais, essas moléculas podem polimerizar, formando fibrilas que compõem as fibras de colágeno, ou seja, a coluna estrutural do colágeno maduro. Os tipos de I a III de colágeno são fibrilares, os tipos IV e V não sofrem clivagem proteolítica dos domínios terminais do procolágeno, que impedem a polimerização para formação de fibrilas.

Embora a baixa tensão de oxigênio na ferida seja o estímulo para a elaboração de fatores vitais do crescimento pelo macrófago, a hipóxia é prejudicial para vários processos fisiológicos normais, em particular para a síntese de colágeno pelos fibroblastos. Há necessidade de oxigênio para

hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas montadas no citoplasma do fibroblasto. Sem oxigênio suficiente, a molécula helical de procolágeno não se forma, e nem é subsequente liberada no espaço extracelular. Além do oxigênio, também é preciso vitamina C para que essas hidroxilações ocorram.

O suprimento de oxigênio na ferida é a nova vasculatura sangüínea, que provém de suas margens. No processo de cura da ferida ocorre um delicado equilíbrio na permeabilidade dos gases, em que a hipóxia impulsiona a migração celular e a angiogênese em seu início. A partir daí, o organismo eleva os níveis de oxigênio, suprimindo as demandas metabólicas associadas mais tarde à síntese de colágeno.

Ao mesmo tempo em que o colágeno está sendo produzido, alguns fibroblastos diferenciam-se em células contráteis chamadas miofibroblastos. Conforme foi descrito por GABBIANI; RYAN; MAJNO (1970), os fibroblastos no tecido de granulação começam a exibir características funcionais similares às células dos músculos lisos. Esta contração é garantida por dois mecanismos distintos: o primeiro, em consequência do ressecamento da crosta que se dá nos primeiros dias; o segundo, pela ação dos miofibroblastos, que são fibroblastos diferenciados, e assumem fenótipo contrátil após uma semana da lesão inicial.

MAJNO & JORIS (1996), relataram que os miofibroblastos são células intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, porém seu mecanismo contrátil ainda não está bem esclarecido, mas seguramente existe um alinhamento dos miofibroblastos ao longo dos novos depósitos de matriz extracelular, formando uniões de célula a célula e gerando forças de tensão que produzem a contração da ferida.

Dentro de horas após ter ocorrido uma lesão cutânea, a reepitelização é iniciada pela migração de células epiteliais, desde as margens da ferida. Os estímulos responsáveis por essa migração (o fator de crescimento epidérmico, ou EGF e o fator das margens livres) são os mesmos que atuam nos fibroblastos. Concomitantemente à migração, as células epiteliais sofrem alterações fenotípicas específicas, como a retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomas intercelulares e formação de filamentos de actina citoplasmáticos na periferia.

Tais alterações liberam as células da membrana basal subjacente e das células epiteliais adjacentes, dando-lhes a capacidade de movimentar-se lateralmente. As células migram sobre uma matriz extracelular provisória, em que uma significativa proporção de fibronectina é produzida pelas próprias células epiteliais migratórias. Quando a superfície da ferida está umedecida e bem oxigenada, ocorre com maior rapidez a migração epitelial.

Se uma escara, ou “casca”, está por cima da ferida, as células migratórias promovem uma dissecção entre a matriz e os debris suprajacentes, mas o processo sofre certo atraso. Tão logo a reepitelização se tenha completado por toda a superfície da ferida, as células epiteliais reverterem ao seu fenótipo normal, a membrana basal é reconstituída pelo novo epitélio, e hemidesmossomas e desmossomas são reformados.

Como ocorre com a síntese do colágeno, a reepitelização é afetada pela tensão do oxigênio, sendo favorecida pela tensão elevada do oxigênio, em decorrência de uma combinação da atividade angiogênica pré existente na ferida e da exposição ao ar.

Para os clínicos que permanecem pesquisando curativos permeáveis ao oxigênio, mas que impeçam o ressecamento da ferida, essas condições representam um dilema.

Nesta fase o leito da ferida está preenchido com tecido de granulação, uma rede de capilares neoformados atravessa o leito da ferida e a rede linfática começa a regenerar. Lentamente o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas e começa a ter aparência de cicatriz, por causa do acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

### 2.1.3 Maturação e Remodelagem

A fase final da cura de uma ferida é a maturação e remodelagem da matriz extracelular. É durante essa fase que a cicatriz adquire sua máxima resistência tênsil, mas esse processo é lento, levando muitos meses ou mesmo anos. Ainda assim, uma cicatriz cutânea completamente matura tem apenas 70% de resistência da pele normal.

A resistência de uma cicatriz conjuntiva fibrosa pode ser atribuída primeiro ao acúmulo da deposição de colágeno e, segundo, à remodelagem das fibrilas de colágeno, de modo que sejam formados feixes maiores dessa proteína, com maior número de ligações covalentes transversais entre as fibrilas.

No início, o tropocolágeno sofre polimerização fora da célula, formando fibrilas pelo uso de forças eletrostáticas fracas e pontes de hidrogênio. Contudo, sob o controle de enzima lisiloxidase, lisinas, hidroxilisinas e lisinas glicosiladas situadas na molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos. Em seguida, os aldeídos formam ligações com outros grupos aldeídos, ou com resíduos de lisina não oxidada.

Essas ligações cruzadas formam-se entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas, de modo que se formam fibras maiores de colágeno, compostas por muitas fibrilas. A formação dessas

fibras maiores de colágeno, apresentando uma quantidade significativa de ligações cruzadas entre as fibrilas, explica a grande resistência tênsil inerente às cicatrizes.

O processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibrilas de colágeno. É atingido um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno, de modo que, embora a produção de colágeno continue elevada numa cicatriz, essa estrutura não cresce de tamanho. A princípio, o colágeno é depositado no “gabarito” de fibronectina de maneira aleatória; dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido, essas fibras de colágeno são subsequentemente digeridas pela enzima colagênase e formadas novamente, em arranjos similares aos ocorrentes no tecido não afetado adjacente. Exemplificando, um tendão em processo de cicatrização primeiramente forma uma cicatriz de tecido conjuntivo por meio de um feixe desordenado de fibras colágenas; essa cicatriz imatura não suportará nem mesmo as tensões normais do dia-a-dia sobre ela aplicadas. À medida que vai ocorrendo a remodelagem da cicatriz, as fibras de colágeno ficam orientadas paralelamente às forças direcionais aplicadas sobre elas, analogamente às fibras de colágeno formadoras de um tendão. Assim sendo, a cicatriz adquire resistência tênsil e, portanto, integridade funcional. A colagênase é produzida por vários tipos celulares na ferida: leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais.

Gradativamente os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas a qual o tecido está sujeito durante a atividade normal (CLARK, 1985).

Embora a síntese do colágeno seja dependente do oxigênio, sua degradação pela colagênase independe da presença desse gás. Assim, a cicatriz de um ferimento sem uma base vascular e oxigenação adequadas tornar-se-á cada vez menor e mais fraca, em decorrência dos processos catabólicos associados à lise do colágeno, sem que ocorra uma síntese concomitante.

A cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrosa acrescida de fibras colágenas. Observa-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais, e os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação, presumindo que possam estar ligados a fatores de crescimento (TODD; DONOFF; CHIANG 1991).

De acordo com as premissas acima, a cura de uma ferida pode ser definida como uma complicada interação de células, fatores de crescimento, componentes da matriz, extracelular e oxigênio, existindo entre esses componentes relações dinâmicas e freqüentemente recíprocas. Exemplificando, a hipóxia, mediante a estimulação e a elaboração de fatores de crescimento pelos macrófagos, impulsiona a migração celular e a angiogênese no espaço ocupado pela ferida.

Com a restauração da circulação sanguínea e o aumento dos níveis de oxigênio na área afetada, ocorre a facilitação da síntese do colágeno e da proliferação celular, havendo a inibição da angiogênese e da migração celular. A presença de fatores de crescimento influencia a produção de componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos, enquanto a composição da matriz extracelular pode influenciar a função celular.

Os anexos da pele, como os folículos pilosos e as glândulas sofrem uma regeneração limitada; a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficitária (JOHNSTON, 1990).

Na tentativa de apresentar os processos de cura e reparo como fases específicas compostas de mecanismos precisos, ocorre uma superposição significativa entre as fases de reparo. Ocorre, também, uma variação significativa na natureza, composição e duração das fases em diferentes feridas, dependendo do local onde se encontra o tecido, o grau de contaminação e infecção bacterianas, irrigação sanguínea e extensão da lesão ao tecido.

## **2.2 Diabetes Mellitus**

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, que decorre da ausência de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As conseqüências do DM no longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sangüíneos. Com freqüência, os sintomas clássicos (perda inexplicada de peso, polidipsia e poliúria) estão ausentes, entretanto, poderá existir hiperglicemia de grau suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido. A síndrome diabética passa por um estágio de distúrbio do metabolismo da glicose, caracterizado por valores glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética antes do surgimento de hiperglicemia mantida, acompanhada do quadro clínico clássico do Diabetes Mellitus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

O Diabetes Mellitus é uma doença que apresenta lesões patológicas nas Ilhotas de Langerhans e em outros órgãos pela insuficiência de insulina, denominada Diabetes Tipo I, ou deficiência da ação da insulina, denominada Diabetes Tipo II. (LERNMARK & OLEFSKY, 1985).

ROBBINS (1996) define o Diabetes Mellitus como uma perturbação crônica do metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, caracterizada por uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, hiperglicemia, glicosúria, tendência ao desenvolvimento de aterosclerose, microangiopatia, nefropatia e neuropatia.



A doença DM é marcada pela heterogeneidade de distúrbios hiperglicêmicos, sendo a hiperglicemia resultado da deficiência insulínica, em presença excessiva - relativa ou absoluta - de glucagon. A deficiência excessiva da insulina desenvolve a cetose e é decorrente de uma alteração pancreática caracterizada por uma menor ação hormonal em nível periférico, ou menor secreção de insulina (WILSON & FOSTER 1998).

As Ilhotas de Langerhans, que são as estruturas responsáveis pela produção de insulina, são atingidas pelas alterações pancreáticas provocando uma diminuição nos níveis de secreção insulínica (GUYTON, 1997).

De acordo com FUCHS & WANNMACHER (1992), a insulina é um hormônio essencialmente anabolizante, que propicia a utilização periférica da glicose nos tecidos muscular e adiposo, inibe a glicogenólise e a neoglicogênese hepática e aumenta a síntese protéica e lipídica. Em contraposição, a ação deficiente de insulina diminui a utilização de glicose pelos tecidos insulino dependentes e mantém um ritmo aumentado de produção endógena, determinando a elevação dos níveis sanguíneos de glicose.

Conforme SCHMIDT & BRANCHTEIN (1992), o estado catabólico, com aumento de mobilização lipídica e degradação protéica, associado às perdas hidreletrolíticas, determina o emagrecimento, proporcional à deficiência insulínica presente. Nos casos mais graves, podem ocorrer cetose, desidratação, cetoacidose ou coma hiperosmolar.

O Diabetes Mellitus apresenta as seguintes características: hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento, freqüente prurido genital, às vezes cetose e repercussões no metabolismo glicídico, lipídico, protéico, hidromineral. No longo prazo, pode ocorrer macroangiopatia -

---

aterosclerose, lesões na microcirculação que leva ao comprometimento dos olhos, rins, nervos, músculos, pele, ossos, placenta, pulmões, entre outros, provocando neles danos funcionais endoteliais, espessamento da membrana basal, aumento da viscosidade e adesividade plaquetária, agregação eritroplaquetária, obliteração e microtrombose (LACERDA, 1988).

### 2.2.1 Drogas Hiperglicêmicas

Existem vários agentes hiperglicêmicos que inibem a secreção de insulina, atuando diretamente na degeneração das células beta, permitindo, assim, que o nível glicêmico no sangue eleve-se. Dentre os agentes hiperglicêmicos podem-se encontrar o diazóxido, streptozotocina, fenitocina e aloxana (GILMAN & GOODMAN 1975).

Compostos químicos tais como a aloxana ou streptozotocina tem o poder de induzir a diabete em animais e servem como modelos para o estudo dos múltiplos aspectos da doença. Dependendo da dose ministrada, síndromes similares à DM sem dependência de insulina e a com dependência de insulina podem ser induzidas (FLATT, et al. 1992).

A droga aloxana (2, 4, 5, 6, - Tetraoxypyrimida; 5 – 6 – Dioxyuracila / monohidratada) produz diabetes química devido aos efeitos citotóxicos nas células beta das ilhotas de Langherans. Ao produzirem DM em ratos, constatam-se alterações histológicas provocadas pela aloxana, que resultam em necrose e completo desaparecimento das células beta das ilhotas pancreáticas (DUARTE, 1996).

Há relato de que a aloxana se acumula rápida e seletivamente na células  $\beta$ , em comparação com outras células. Os alvos sob o efeito da

---

aloxana, que levam à inibição da liberação de hormônio, não são necessariamente os mesmos que induze à apoptose e ou necrose das células  $\beta$  (GORUS; MALAISSE; PIPELEERS, 1982).

Vários relatos indicam direta ou indiretamente que aloxana afeta o potencial da membrana e os canais de ion das células  $\beta$  (HERSON; ASHFORD, 1997).

A inibição da secreção de insulina provocada pela aloxana é bem documentada mas os mecanismos subjacentes ainda não estão claros. Ainda se desconhecem quais processos estão ligados à destruição de células- $\beta$  (ASAYAMA; ENGLISH; SLONIM; BURR, 1984)

### 2.2.2 Diabetes e a Reparação Tecidual

GOTH et al (1957) relataram que animais diabéticos aloxânicos não desenvolveram a característica reação anafilactoide após injeção endovenosa de dextrana ou clara de ovo e o pré-tratamento com insulina restaura esta capacidade.

NAGY; REDEI; KARADY (1961) indicaram que animais diabéticos aloxânicos produzem menos tecido de granulação que ratos normais, mesmo sob a influência de hormônio de crescimento aplicado localmente.

ROSENTHAL et al. (1962) descrevem que as cicatrizes de ratos diabéticos aloxânicos demonstram fraca resistência mecânica, que podem ser atribuída às alterações bioquímicas no local da lesão.

ABBEY; COHEN; SHKLAR (1972) detectaram que a indução química de longa duração do DM por drogas como a aloxana e a estreptozotocina, interfere diretamente com o metabolismo dos carboidratos, das proteínas e

dos lipídios, ocasionando nos animais um acentuado estado de debilidade orgânica e prejudicando a atividade celular.

GARCIA-LEME & HAMAMURA (1974) relataram que a insulina exerce importante controle local sobre a permeabilidade vascular, sendo este efeito direto não mediado por glicocorticóides.

OTTLECZ; KOLTAI; DEKOV (1976) também relataram que o edema desenvolvido em pata de ratos após a aplicação de injeções de carragenina ou dextrana apresenta-se reduzido em animais diabéticos aloxânicos e que a aplicação de insulina restaura a capacidade de resposta.

GRANDINI (1978) realizou um estudo histológico em ratos, dos efeitos do diabetes induzido por pancreatectomia parcial na cicatrização de feridas e observou que os animais diabéticos apresentaram retardo na reparação. Estas diferenças foram observadas principalmente, no processo de diferenciação dos fibroblastos. Conseqüentemente, a maturação do tecido conjuntivo foi acentuadamente diminuída, quando comparada à do grupo-controle.

GOODSON & HUNT (1979) relataram que existem evidências clínicas e experimentais de que as anormalidades de cicatrização no diabético são atribuídas principalmente ao déficit na formação de colágeno, levando a defeitos no tecido de granulação e vasos sangüíneos.

SCHNEIR et al. (1979) estudaram os efeitos específicos do diabetes induzido pela estreptozotocina após injeção de prolina em ratos, no metabolismo do colágeno da pele, aorta e intestino e observaram que houve uma diminuição de colágeno na pele e aorta, sugerindo decréscimo da síntese de fibras colágenas no estado diabético.

Os trabalhos desses autores sugerem que, além do retardo e diminuição da síntese de fibras colágenas na pele de ratos diabéticos, há um

maior catabolismo das fibras sintetizadas, diminuindo o colágeno existente nos tecidos.

Segundo GARCIA-LEME (1981), a insulina é um hormônio pró-inflamatório e, portanto, em sua ausência estão alteradas as características da reação inflamatória.

BOWERSOX (1986), em um estudo do metabolismo do colágeno em ratos diabéticos utilizando radioisótopos, constatou que, além da baixa síntese de colágeno, existe também elevada degradação do colágeno pré-existente na pele dos animais.

CORREIA & PIRES (1988) atribuíram o déficit da resposta inflamatória de animais diabéticos a dois fatores principais: a hiperglicemia e a ausência de insulina, dando mais créditos à segunda hipótese.

NISHIGAKI (1989) descreveu que, no processo de cicatrização de ratos diabéticos, a resposta inflamatória foi insignificante, ocorrendo incompleta formação da rede de fibrina, retardo na epitelização e reduzida atividade fibroblástica.

ROSENBERG (1990) considerou que o risco de complicações de feridas entre pacientes diabéticos é atribuído a fatores de ordem geral, como idade, obesidade, doenças microvascular e alterações na resposta imune, afetando a fase inflamatória da cicatrização.

FAHEY; SMOLLER; SHIRES (1991) , estudaram sobre a infiltração leucocitária e o aparecimento das citocinas nos leitos das feridas em ratos normais e diabéticos induzidos pela estreptozotocina e afirmaram que o Diabetes Mellitus é uma doença reconhecida como um fator de risco, que compromete a cicatrização das feridas.

CUTLER et al. (1991), em estudos sobre a função leucocitária dos polimorfonucleares em pacientes adultos insulino-dependentes não

controlados, observaram alterações na depressão quimiotática, na fagocitose e na morte de *Porphyromonas gengivalis*, além de acentuada produção de ânion superóxido.

CRAWFORD & CONTRAN (1996) descreveram que o sistema imune apresenta diversas reações desfavoráveis no estado diabético. Mais atenção tem sido dirigida às alterações na imunidade celular, como também na imunidade humoral. A capacidade de opsonização de células do sangue em diabéticos – capacidade dos anticorpos de resistir às bactérias e aumentar a fagocitose – é anormal. A parte do sistema celular que mais demonstra essa anormalidade é relacionada à fagocitose.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Animais de Experimentação

A amostra foi composta inicialmente de 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem WISTAR-ADOLFO LUTZ-UFMS, com peso corpóreo variando entre 230 a 350 gramas, adultos procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -UFMS, Campo Grande, MS.

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15m<sup>2</sup>, com 4 animais por gaiola, mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida<sup>1</sup> e água “*ad libitum*”, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da sua utilização no experimento.

#### 3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos distintos (Grupos 1 e 2). Sendo 12 animais diabéticos aloxânicos para compor o grupo experimental 1 (grupo 1) e 12 animais escolhidos de forma aleatória para compor o grupo não diabético (Grupo 2).

Os grupos foram novamente divididos em 3 subgrupos e receberam as seguintes denominações:

- Grupo 1 diabéticos aloxânicos: subgrupo 1/3 dias, subgrupo 1/7 dias e subgrupo 1/14 dias.
- Grupo 2 não diabéticos: subgrupo 2/3 dias, subgrupo 2/7 dias e subgrupo 2/ 14 dias.

### 3.3 Indução ao Diabetes Aloxânico

Da amostra inicial de 60 animais foram retirados 12 animais para compor o grupo 2 (ratos não diabéticos), os 48 ratos que sobraram ficaram em jejum prévio por 24 horas, pois nestas condições tornavam-se mais susceptíveis ao diabetes. Após anestesia por inalação de Éter etílico, eram contidos em decúbito dorsal, para receber uma injeção intravenosa (veia dorsal do pênis) de Aloxana (2, 4, 5, 6, - Tetraoxypyrimidina; 5 – 6 – Dioxiyuracila ) – SIGMA<sup>2</sup> (Figura 2). De uma solução estoque de 50mg de Aloxana e 0,8 ml de soro fisiológico preparada no momento da sua utilização, aplicava-se 0,1 ml de solução a cada 100 gramas de peso corporal, resultando em dose final de 62,5 mg de Aloxana/kg de peso. Seis horas após a injeção, os animais foram tratados com solução de glicose (10%), para evitar convulsões e morte, comuns na fase hipoglicêmica. Após 24 horas, foi retirada a glicose da água. Para constatar o diabetes, utilizou-se o seguinte padrão de monitoramento glicêmico: verificação da glicemia antes da indução ao diabetes; verificação da glicemia 72 horas após a indução ao diabetes, sendo que os animais que não apresentaram valores iguais ou superior a 250 miligramas por decilitro de sangue foram descartados; verificação da glicemia, no quinto dia do tratamento, para confirmação da permanência do diabetes e finalmente verificação do diabetes no dia do sacrifício, para avaliar qualquer processo de reversão do diabetes. As verificações foram feitas retirando-se sangue da veia da cauda sendo colocada uma gota sobre fitas

---

<sup>1</sup> NUVILAB – NUVITAL Nutrientes Prod. Vet. Ltda – Curitiba PR

<sup>2</sup> Alloxan – SIGMA Chemical Company, St. Louis, missouri, Lot. 39h1482, EUA

<sup>3</sup> Advantage II – Roche nº 2030543, code 282, 222; Lot. 434282, Montreal Canada



reagentes da marca ADVANTAGE<sup>3</sup> II e a leitura feita em um aparelho GLUCOMETER.

Dos 48 animais induzidos ao diabetes, 19 não apresentaram índice glicêmico acima de 250 miligramas por decilitro e foram descartados, 2 morreram durante a experimentação, 3 morreram na fase hipoglicêmica e 10 morreram por hiperglicemia.

### 3.4 Produção das Feridas Cutâneas

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com *Quetamina*, na dose de 0,2 ml do anestésico para cada 100 gramas de peso corporal.

Realizou-se a tricotomia da região dorsal, com lâmina de barbear, seguindo-se então, a anti-sepsia com povidine-iodine e delimitação circular do campo operatório com campo esterilizado fenestrado. A ferida era desenhada na pele com caneta dermográfica, com diâmetro de 1,5 cm., confirmado com um paquímetro. Procedeu-se à incisão com um bisturi de lâmina 19, comprometendo toda a espessura da pele, que seria removida (Figura 1,3,4 e 5).

Após o ato operatório, os animais foram recolocados em gaiolas limpas, sendo quatro em cada uma, com água e ração apropriada, à vontade. Dois animais morreram durante o procedimento anestésico e foram substituídos, para dar continuidade à pesquisa.

Ao final do 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias os animais foram identificados, pesados e sacrificados por inalação excessiva de éter etílico.

A seguir cada rato foi contido na mesa cirúrgica, efetuando-se a retirada das amostras do tecido cicatricial.

---

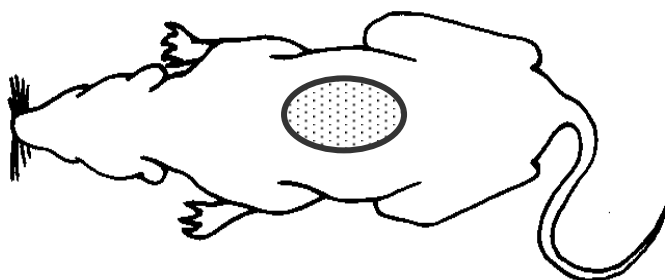


Fig. 1 - Diagrama mostrando o local das lesões na região dorsal do animal

### 3.5 Procedimentos Histológicos

Os segmentos destinados à histologia foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura preparando-se três lâminas com dois cortes cada uma. Cada lâmina foi corada por um processo de coloração, sendo uma com HE, outra com *tricrômico de Masson* e uma terceira lâmina com o método imunohistoquímico, totalizando três lâminas para cada amostra.

As lâminas para estudo de fibras colágenas foram coradas por tricrômico de Masson. Já para a análise de macrófagos utilizou-se o processo de imunohistoquímica<sup>4</sup>.

### 3.6 Análise Morfométrica

Para análise destas lâminas, foi realizada a avaliação histológica por digitalização de imagens<sup>5</sup> e análise computacional por meio de um programa

<sup>4</sup> Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Botucatu, SP.

<sup>5</sup> Laboratório de Informática Aplicado à Saúde (LIAS) do Departamento de Histologia da UNIDERP, Campo Grande, MS.

específico de processamento e análise de imagens (IMAGELAB)<sup>6</sup>, baseado nos princípios de espectrofotometria.

Para a quantificação das áreas representativas de colágeno, foram digitalizados cinco campos, usando-se um microscópio Axiolab (Carl Zeiss, objetiva 20x) acoplado a uma câmara para captura de imagem Sanyo Digital Active BLC, conectada ao micro computador Pentium III 700 MHz que estava equipado com placa de vídeo.

Cada campo digitalizado apresentou uma resolução de 640 pontos na horizontal por 480 pontos na vertical e 24 bits de cores (16 milhões de cores). O campo digitalizado correspondeu a uma área de 395  $\mu$  de largura por 300  $\mu$  de altura na imagem real.

Antes do processo de quantificação, todas as imagens foram digitalizadas, padronizando-se a intensidade de luz do microscópio e a altura do condensador. As áreas de colágeno foram separadas na imagem usando-se a distribuição de cor como parâmetro discriminante.

Para cada imagem quantificada, utilizou-se o mesmo intervalo de cor, para separar a área a ser quantificada. O intervalo de cor padronizado foi definido de forma empírica, no momento inicial do experimento. Através de tentativa e erro, uma faixa de cor foi ajustada, até separar as áreas representativas de colágeno na imagem.

Posteriormente, o mesmo intervalo foi utilizado para identificar o colágeno a ser quantificado em todos os campos digitalizados. Na etapa seguinte, calculou-se a área ocupada e a quantidade de luz absorvida pelo colágeno em cada um dos campos.

Também foi realizada pesquisa de macrófagos através do método imunohistoquímico, utilizando-se o sistema avidina-biotina peroxidase – ABC

---

<sup>6</sup> Software de Processamento e Análise de Imagem IMAGELAB (.Softium Informática Ltda)

(HSU; RAINE; FANGER, 1981), através do uso do anticorpo monoclonal HAM 56 (GOWN; WEVER; BATTIFORA, 1993).

Para a detecção do HAM56, cortes de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de todas as amostras foram desparafinizados imediatamente antes da realização da técnica de imunohistoquímica, sendo, posteriormente, hidratados e lavados com solução salina histoquímica tamponada (SST). Após a desparafinização, os cortes foram incubados em forno de microondas caseiro por 15 minutos em solução tampão de citrato pH 6,4 (GOWN; WEVER; BATTIFORA, 1993). A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo monoclonal HAM56<sup>7</sup> diluído à 1:500 por pelo menos 12 horas durante a noite, à temperatura aproximada de 4°C.

Após lavagem em SST, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo, produzido em cavalo e utilizado na diluição de 1:200. A seguir, os cortes foram incubados com o complexo ABC Elite®<sup>8</sup> por 45 min. O complexo ABC foi preparado na proporção de 5 $\mu\text{l}$  de biotina em 5ml de SST.

Para visibilização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3, diaminobenzidina (DAB)<sup>9</sup>, 1mg/ml, na concentração de 1mg/ml em trizma e em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,1%. Os cortes foram então contra-corados com verde de metila por aproximadamente 5 minutos. Com exceção da incubação em forno de microondas e da incubação overnight dos anticorpos primários, todas as demais incubações foram realizadas à temperatura ambiente. Para a análise morfométrica de macrófagos existentes utilizou-se o mesmo programa de computador que para a leitura das fibras colágenas.

---

<sup>7</sup> Monoclonal mouse, antihuman macrophage, HAM 56. Code n° MO632, Lot. n°126, DAKO CORP, Carpinteria, Califórnia EUA

<sup>8</sup> Elite® - Catálogo n°PK 6100, Vector Corp., Burlingame, Califórnia, EUA

<sup>9</sup> DAB – Catálogo n°D5637, SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA

### 3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pela variância segundo dois critérios, com quatro repetições. Em seguida, aplicou-se o teste TUKEY, considerando a natureza das variáveis estudadas ou a variabilidade das medidas efetuadas, sendo utilizado para tanto o software NTIA<sup>10</sup>.

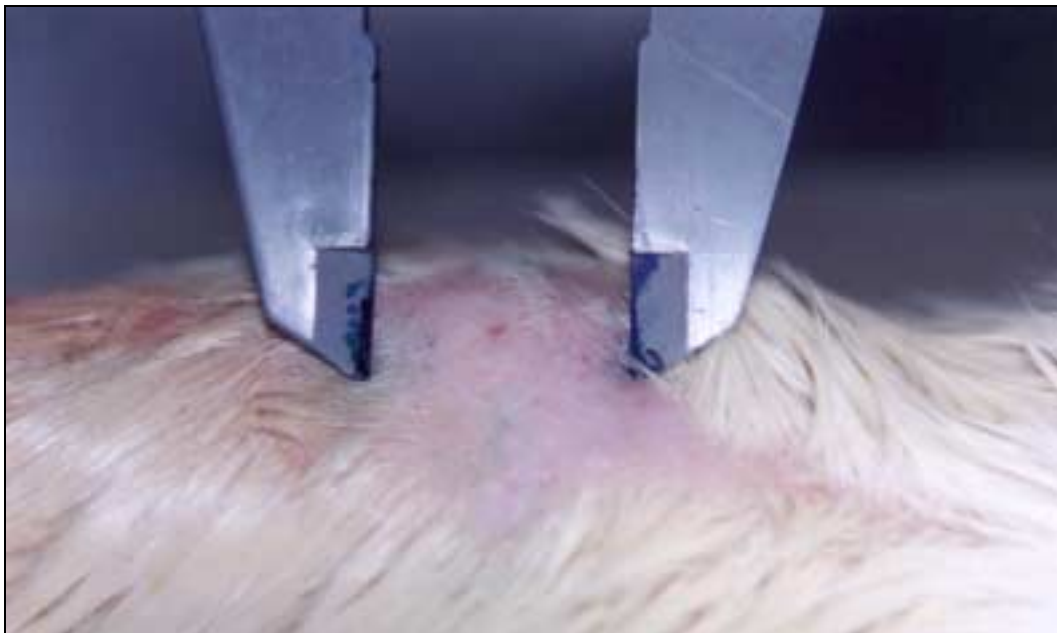
Para estudar a diferença percentual ( $\Delta\%$ ) de fibras colágenas, e macrófagos entre os dias do experimento em cada amostra, fixou-se em 0,05 ou 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ) o nível de rejeição da hipótese de nulidade( SIEGEL & CASTELLAN, 1988).

---

<sup>10</sup> Núcleo de Tecnologia e Informática Agropecuária - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)



**Fig.2** Indução ao diabetes, através de injeção intravenosa de aloxana (veia dorsal do pênis)



**Fig. 3** Tricotomia e medida prévia através de um paquímetro.



Fig. 4 Execução da ferida através de bisturi Nº 19



Fig. 5 Retirada do tecido



Fig. 6 Controle da glicemia sangüínea através do Glucometer





Fig. 7 Aquisição de imagem, para análise no programa IMAGELAB, A - Microscópio de luz Axiolab (Carl Zeiss), B - Câmera Sanyo Digital Active BLC ,C - micro computador Pentium III 700MHz

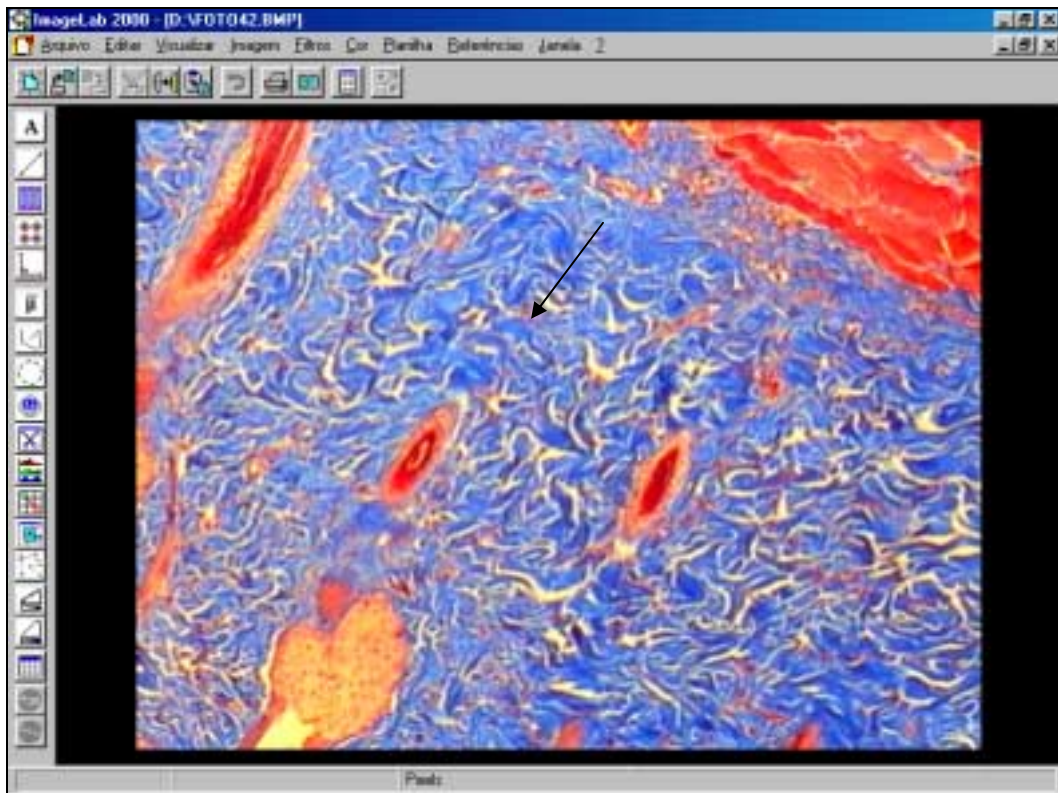


Fig. 8 Representação da tela de captura do programa IMAGELAB, a seta indica a área de colágeno a ser quantificada.

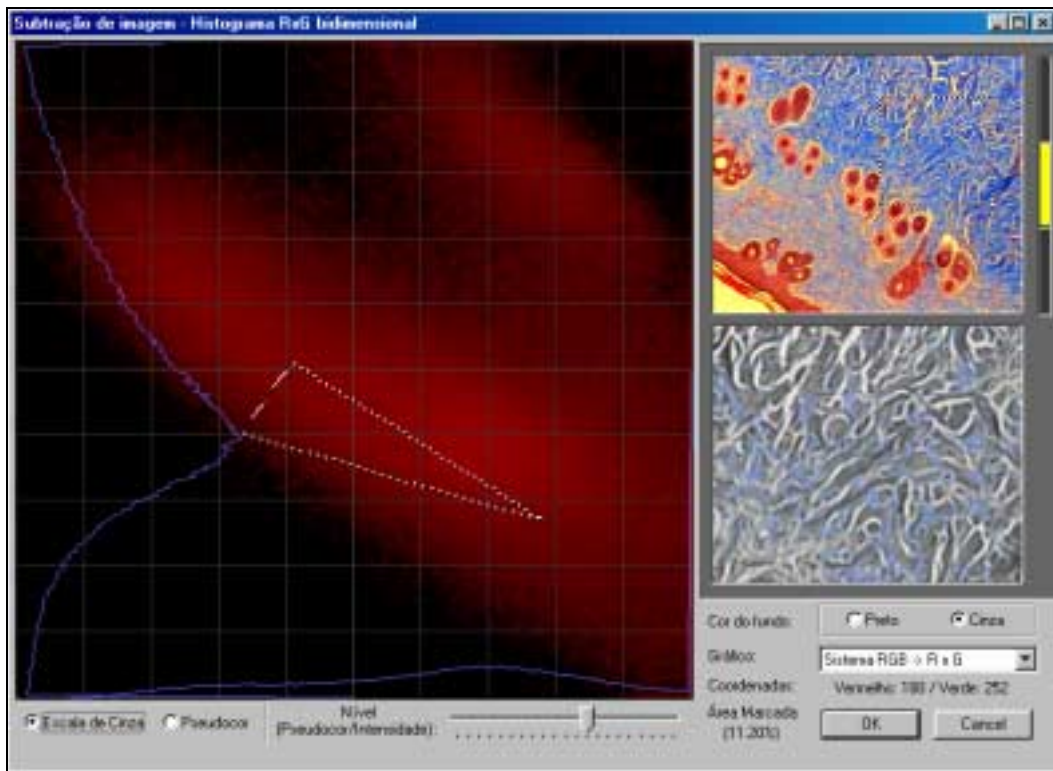


Fig. 9 Representação da tela do programa IMAGELAB, análise do espectro da cor azul para quantificação do colágeno através do histograma de subtração de imagem.

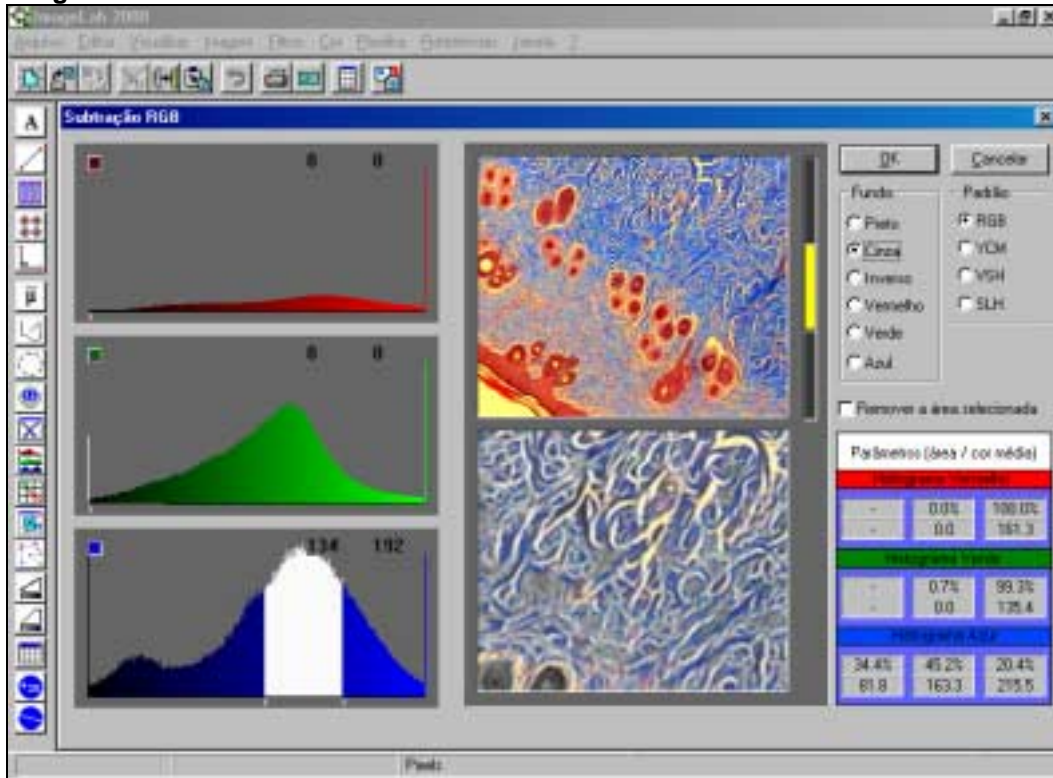


Fig. 10 Representação da tela do programa IMAGELAB, análise da variância do espectro de azul para fibras colágenas, pelo sistema RGB de subtração de imagem.



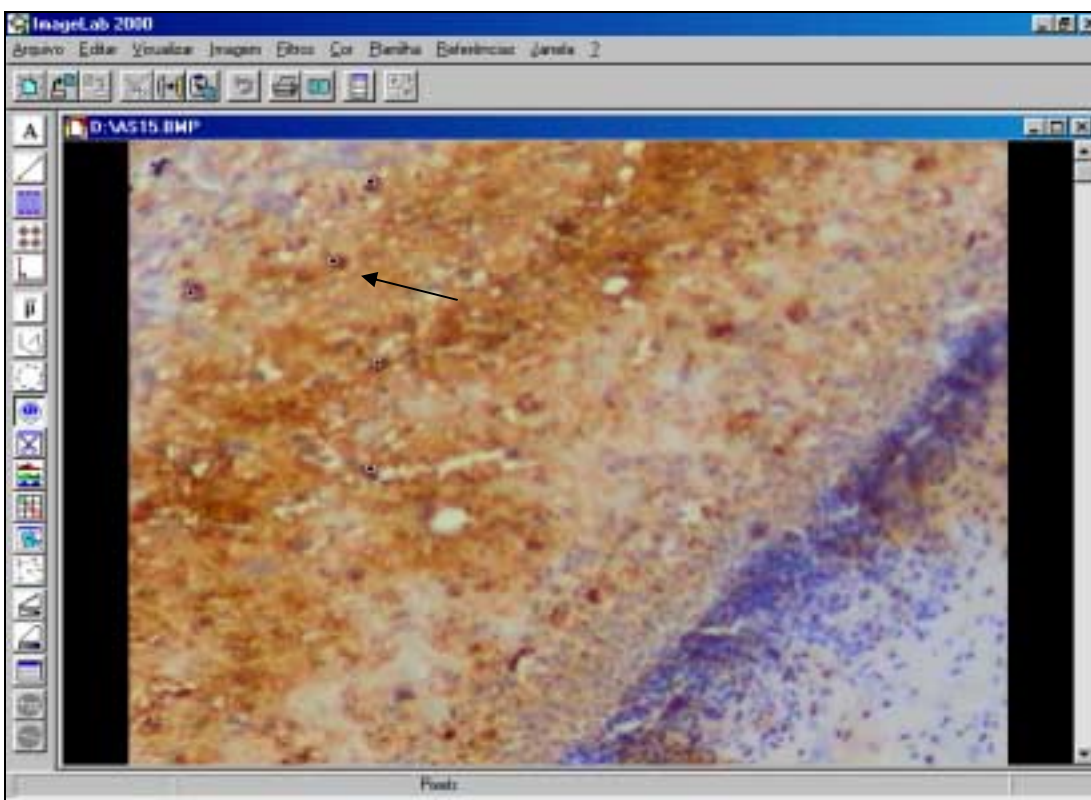


Fig. 11 Representação da tela do programa IMAGELAB, contagem de macrófagos, lâmina de imunohistoquímica HAM 56, a seta indica o núcleo de um macrófago identificado pelo programa.

	C	D	E	F	G	H	I	J
4	Área		% de regiões:	13,8%				
5	475		em relação a:	Área total da imagem				
6								
7			Densidade	#	132,388			
8	Área		óptica média	#	114,044			
9	1,00000		das áreas	#	114,880			
10			marcadas	Área	170,432			
11								
12	MORFOMETRIA		ABSORÇÃO DE COR			Densidade	DIÂMETRO	
13	Perímetro	Fator de forma	B	G	B	da estrutura	Diâm. Transv.	Diâm. Max
14	1471	0	1471	1471	1471	1471	0	1
15	32759,470	0,000	5567354,808	4795949,640	4831084,530	196880,849	0,000	7572
16	22,270	#DN/O	3784,742	3260,333	3284,218	133,842	#DN/O	5
17	38,455	#DN/O	8627,986	7566,374	7330,221	16,080	#DN/O	7
18	675,846	0,000	105000,031	114096,703	112929,422	170,080	0,000	76
19	4,000	0,000	104,000	107,000	66,000	81,544	0,000	0
20	1,965	#DN/O	492,013	386,659	374,592	0,822	#DN/O	0
21	2,582	#DN/O	546,616	508,158	482,798	1,080	#DN/O	0
22								
23								
24								
25								
26	Perímetro	Fator de forma	B	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Max
27	10,628		812,400	867,600	1100,400	154,467		3
28	8,000		432,000	413,000	431,000	141,778		2
29	15,657		1954,615	2123,077	2306,539	141,872		5
30	13,414		1326,150	1506,250	1800,900	147,550		3

Fig. 12 Representação da planilha de cálculo do programa IMAGELAB.

#### 4 RESULTADOS

Anteriormente à administração da aloxana, os animais foram pesados para controle e para propiciar o cálculo da dosagem da aloxana kg/peso.

**Tabela 1 -- Taxa de variação de peso pré e pós - experimentação**

	Peso Início	Peso Final	Peso Início	Peso Final
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2
	280	196	305	295
	293	275	290	278
	310	285	297	288
	285	273	278	269
	310	282	310	294
	258	245	313	312
	283	267	305	292
	279	259	298	294
	310	294	320	307
	311	289	268	263
	297	276	291	288
	309	290	315	310
<b>Média</b>	<b>295,0</b>	<b>269,2</b>	<b>301,5</b>	<b>290,0</b>
<b>Coeficiente</b>	<b>5,8</b>	<b>10,0</b>	<b>5,1</b>	<b>5,2</b>
<b>Variação %</b>				
<b>Desvio Padrão</b>	<b>17,0</b>	<b>25,8</b>	<b>15,4</b>	<b>14,5</b>

\* peso em quilogramas

Tabela 2 – Taxa de glicemia dos grupos 1 e 2

	Grupo 1	Grupo 2
	260	70
	267	100
	345	73
	341	69
	490	80
	261	85
	257	70
	345	71
	279	70
	281	100
	298	91
	310	87
<b>Média</b>	<b>281,0</b>	<b>80,50</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>64,3</b>	<b>11,8</b>
<b>Coeficiente de variação%</b>	<b>20,9</b>	<b>6,7</b>

\*mg de glicose por decilitro de sangue

Os dados obtidos através da digitalização de imagens para % de fibras colágenas correspondem à média de cinco campos de imagem para cada lâmina obtida a partir das amostras dos grupos 1 (Animais Diabéticos) , grupo 2 ( Animais Não Diabéticos), demonstrados nas Tabelas 3, 4 e 5, que correspondem respectivamente às amostras retiradas aos 3º, 7º e 14º dias após a lesão.

Tabela 3 – Média do percentual de fibras colágenas 3 dias após a lesão

	Grupo 1	Grupo 2
	19,1	16,5
	13,0	19,4
	14,3	22,1
	17,2	20,6
<b>Média</b>	<b>15,9</b>	<b>19,6</b>

\* p<0,05

**MÉDIA (Grupo 1) < MÉDIA (Grupo 2)**

Os dados obtidos da tabela acima estão plotados na figura abaixo onde se pode observar a média e a variância dos resultados dos grupos de 1 e 2, no terceiro dia após indução do ferimento.

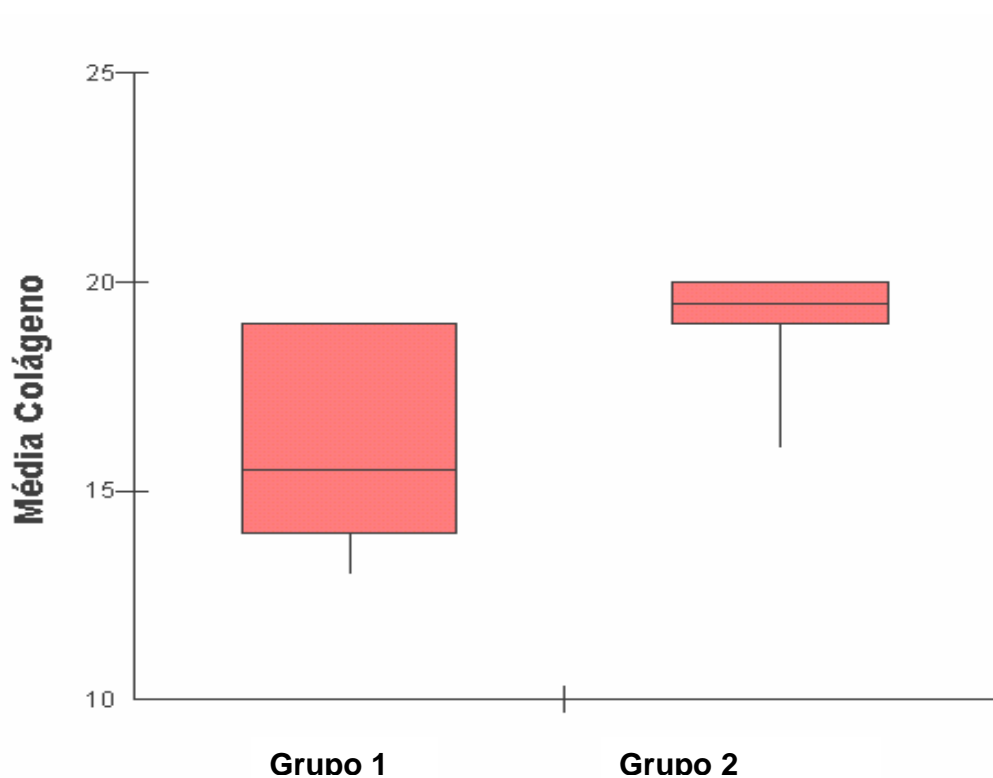


Fig. 13 Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos - 3 dias, indicando valor máximo, mínimo e a média.

Tabela 4 - Média do percentual de fibras colágenas 7 dias após a lesão

	Grupo 1	Grupo 2
	19,9	28,3
	17,5	26,1
	20,9	23,7
	21,0	26,4
<b>Média</b>	<b>19,8</b>	<b>26,1</b>

\*p<0,05

MÉDIA (Grupo 1) < MÉDIA (Grupo 2)

Os dados obtidos da tabela acima estão plotados na figura abaixo onde se pode observar a média e a variância dos resultados dos grupos de 1 e 2, no sétimo dia após indução da lesão.

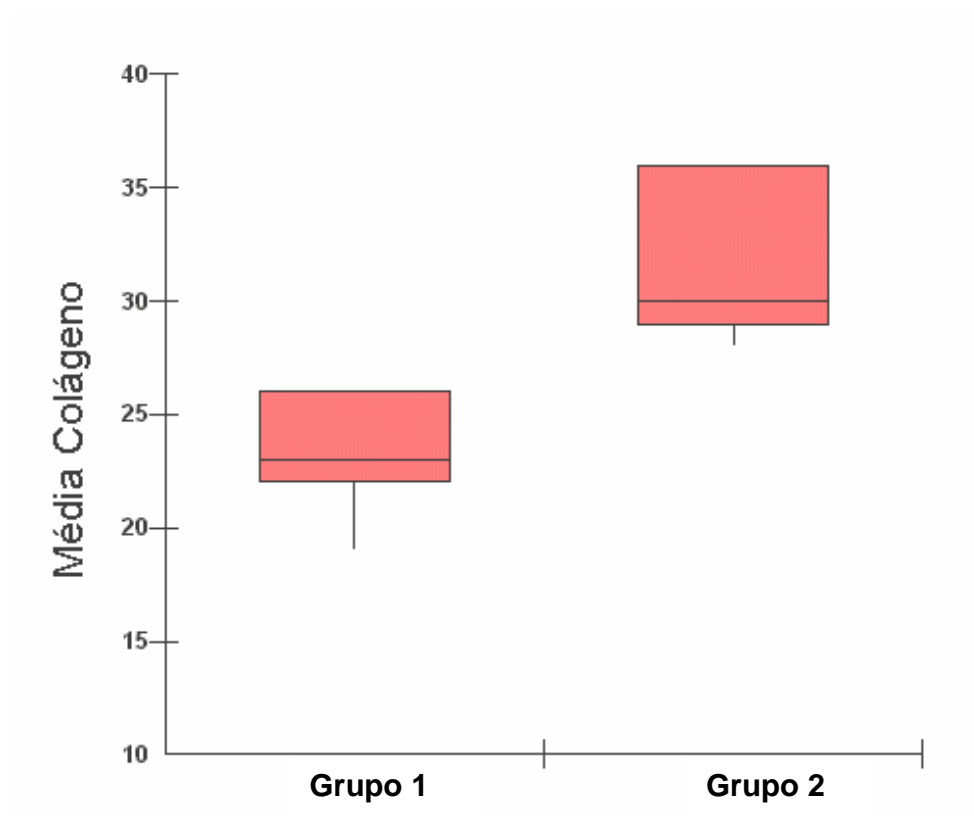


Fig. 14 Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos - 7 dias, indicando valor máximo, mínimo e a média.

Tabela 5 - Média do percentual de fibras colágenas 14 dias após a lesão

	Grupo 1	Grupo 2
	22,6	28,6
	24,3	29,6
	19,4	31,0
	26,2	36,8
Média	23,2	31,5

\*p<0,05

MÉDIA (Grupo 1) < MÉDIA (Grupo2)

Os dados obtidos da figura acima estão plotados no gráfico abaixo onde pode-se observar a média e a variância dos resultados dos grupos, no décimo quarto dia após indução da lesão.

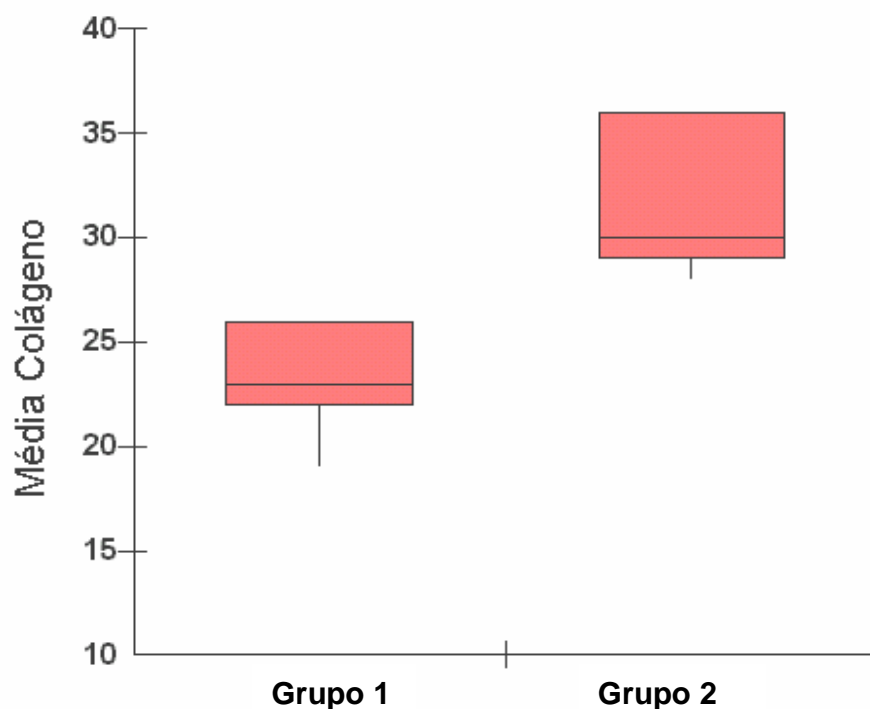


Fig. 15 Gráfico comparativo da média de colágeno entre os grupos - 14 dias



Tabela 6 - Percentual total de fibras colágenas

	Grupo 1	Grupo 2
3 dias	15,9	19,6
7 dias	19,8	26,1
14 dias	23,2	31,5

Os dados obtidos na Tabela 6 foram submetidos ao teste de Tukey tomando como princípio que as médias dos grupos 1 e 2 representadas pelas mesmas letras não são significantes estatisticamente.

Tabela 7 - Teste "Tukey" para a variável: "FIBRAS" Grupo 1

Trat = Grupo 1			
Dias	N	Fibras	Grupo
14	4	23.1	a
7	4	19.8	a b
3	4	15.9	b

g.l = 12 qme = 6.559 alfa = 0.05 \* médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes

Tabela 8 - Teste "Tukey" para a variável: "FIBRAS" Grupo 2

Trat = Grupo 2			
Dias	N	Fibras	Grupo
14	4	31.5	a
7	4	26.1	b
3	4	19.6	C

g.l = 12 qme = 6.559 alfa = 0.05 \* médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes

Os dados resultantes dos grupos 1 e 2 foram plotados no gráfico abaixo.

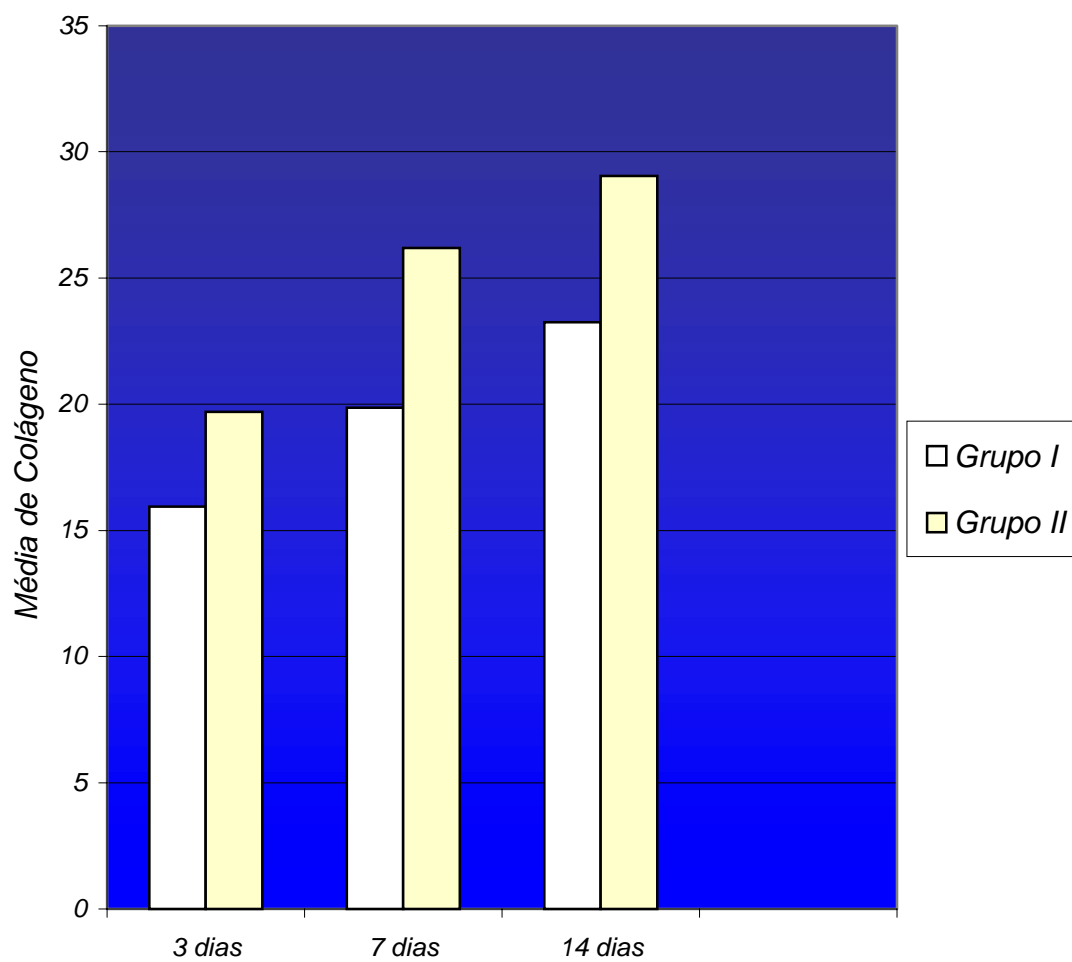
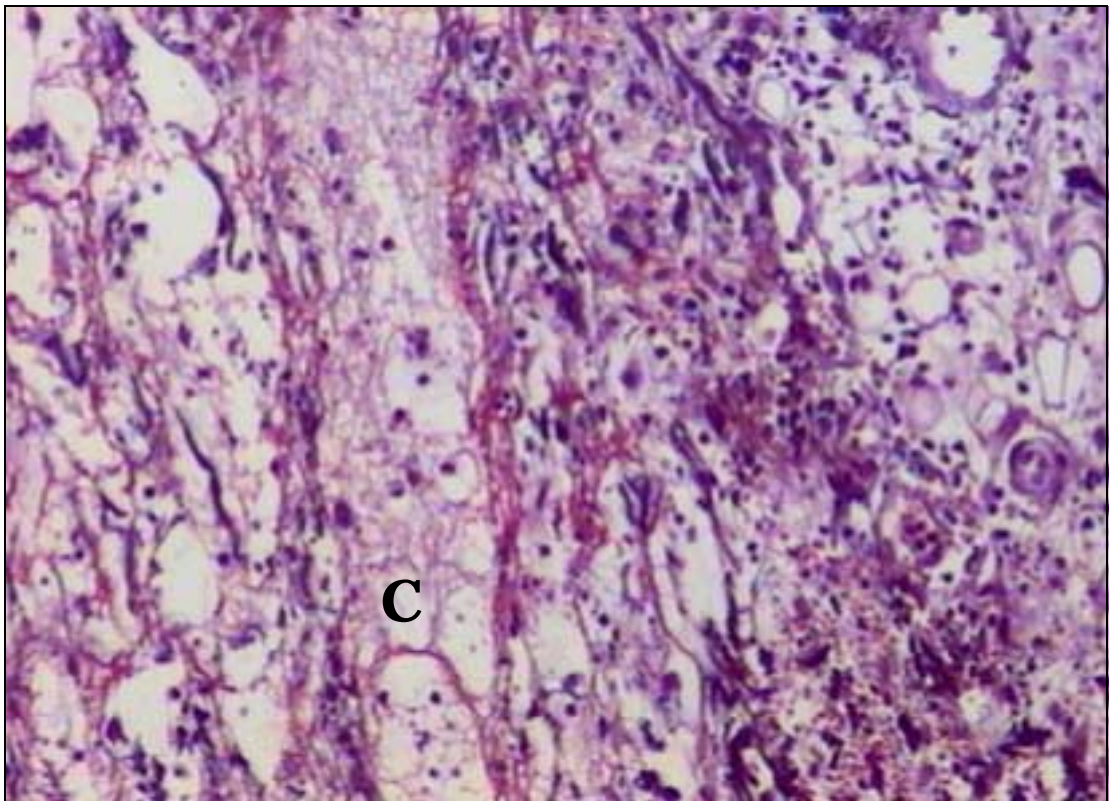
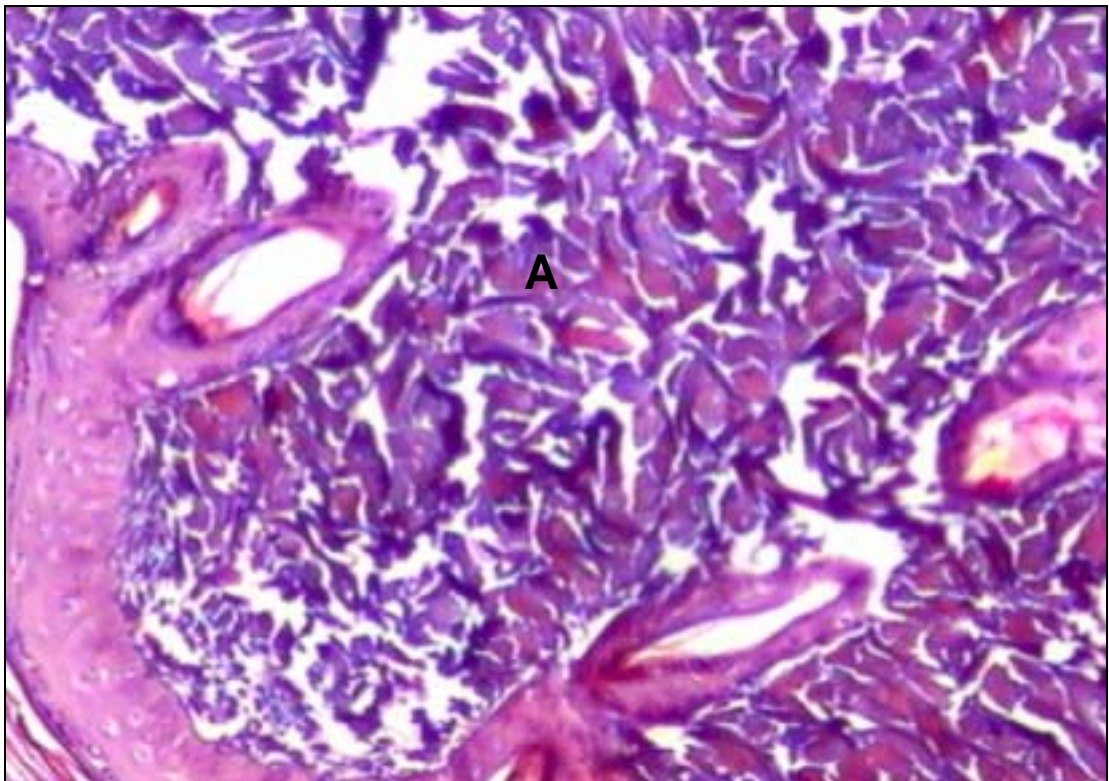


Fig. 16 Gráfico comparativo das médias de colágeno entre os dias

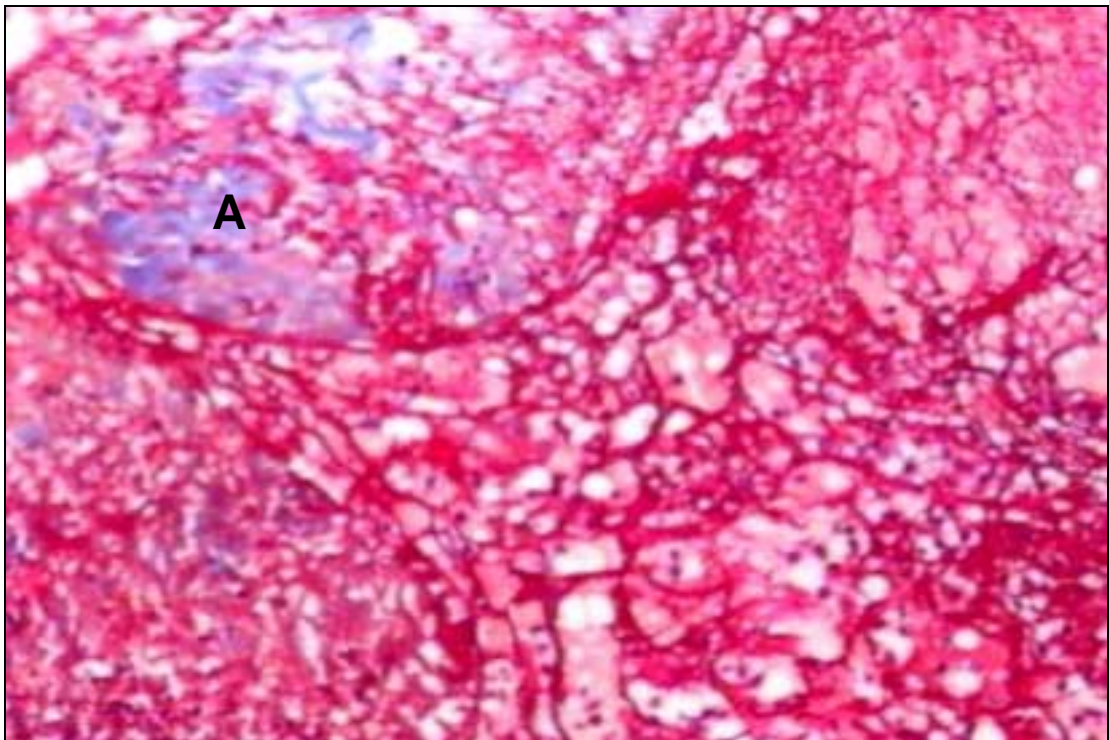


**Fig. 17 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar a escassez de fibras (C ) grupo 1 ( animais diabéticos ) 3 dias Tricrômico de Masson 200X.**

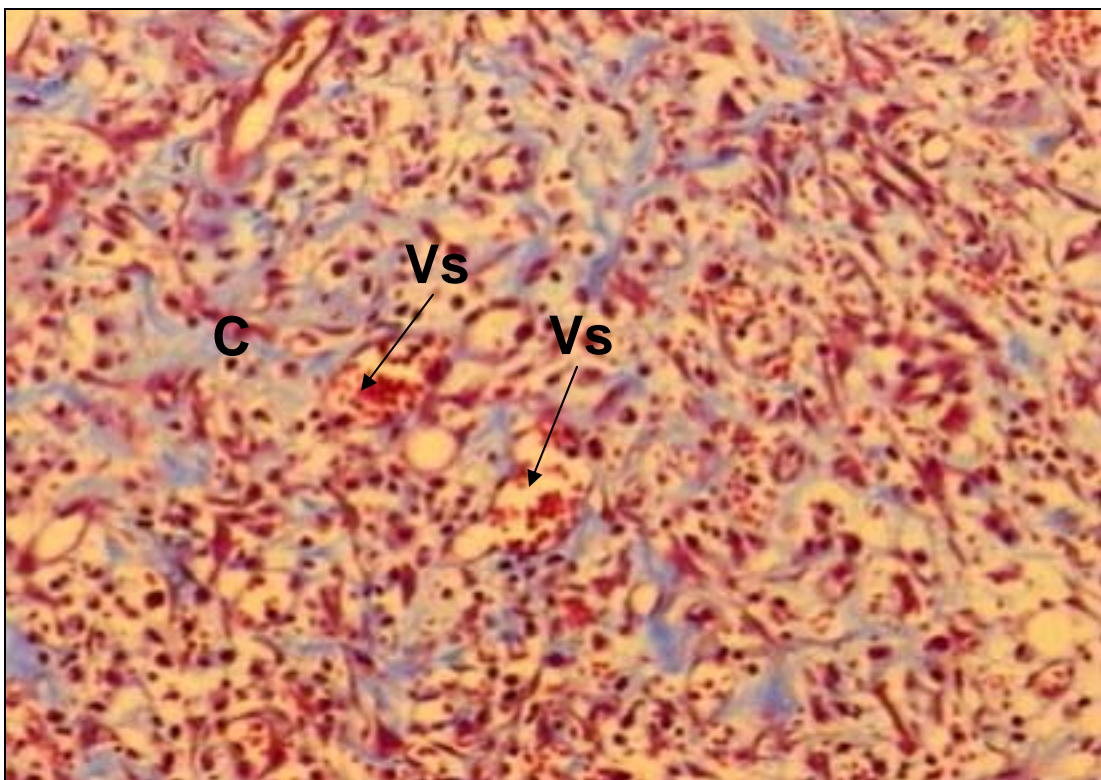


**Fig. 18 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar fibras em fase de organização (A) grupo 2 (animais não diabéticos) 3 dias Tricrômico de Masson 200X.**



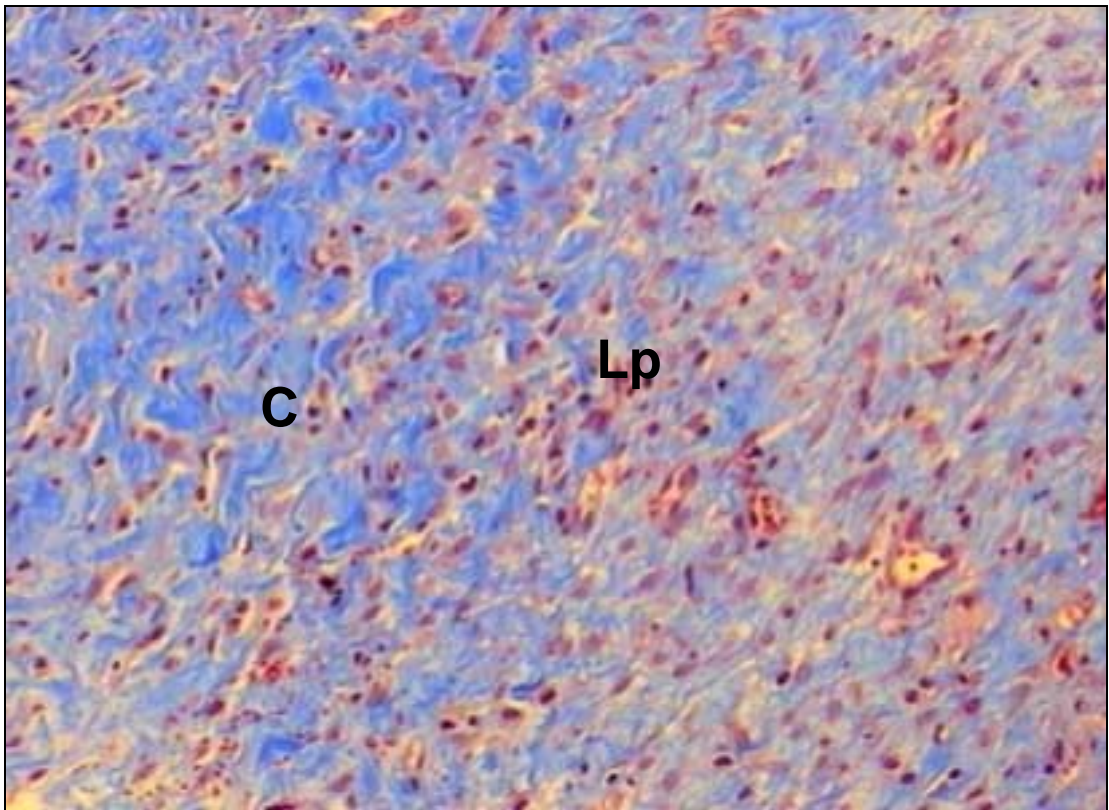


**Fig. 19 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar o arranjo das fibras colágenas (A) grupo 1 (animais diabéticos) 7 dias Tricrômico de Masson 200X.**

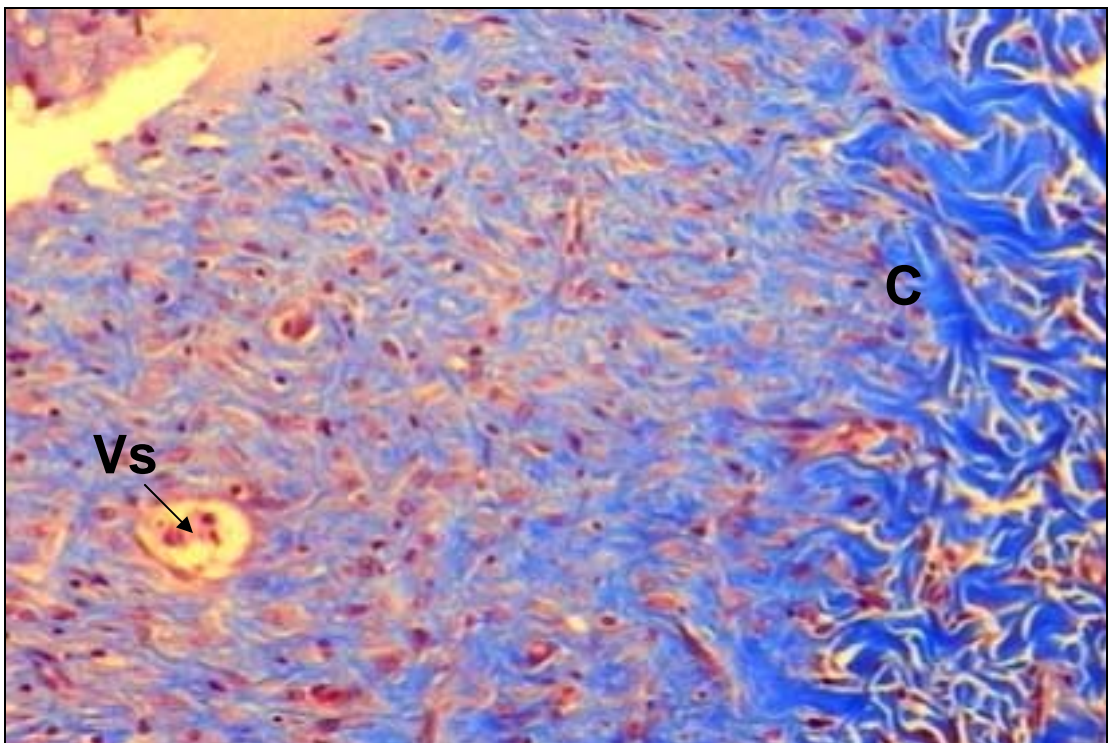


**Fig. 20 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas, observar a organização das fibras colágenas (C) e a proliferação endotelial (seta Vs) grupo 2 (animais não diabéticos) 7 dias Tricrômico de Masson 200X.**





**Fig. 21 – Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas com características mais densas e células linfoplasmocitárias (Lp) grupo 1 (animais diabéticos) 14 dias Tricrômico de Masson 200X**



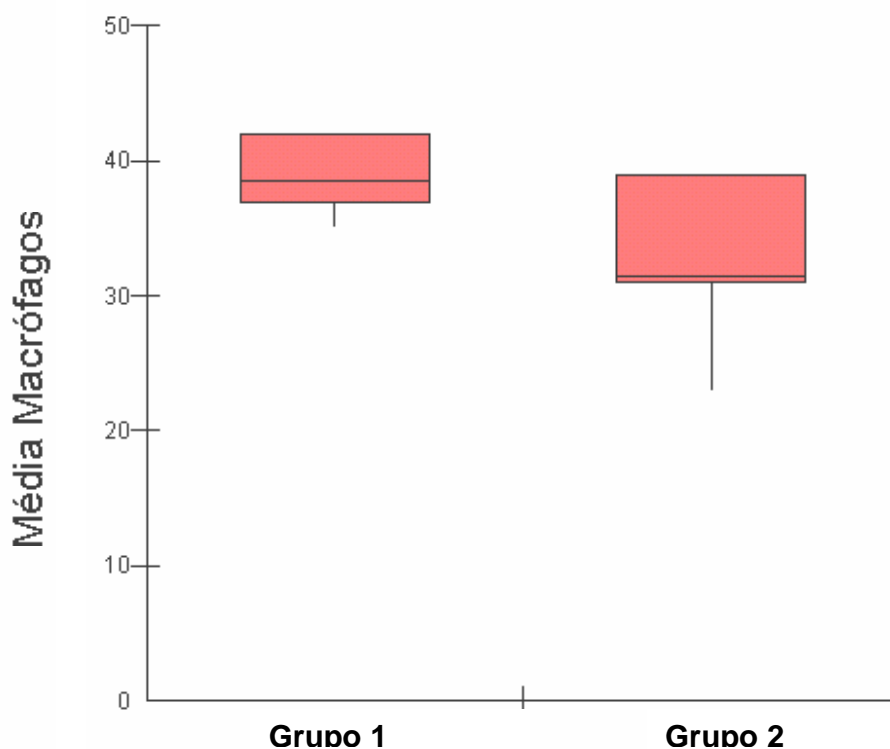
**Fig. 22 - Fotomicrografia mostrando concentração de fibras colágenas (C); e vasos sanguíneos (seta Vs) grupo 2 (animais não diabéticos) 14 dias Tricrômico de Masson 200X.**

**Tabela 9 - Número de macrófagos: 3 dias após a lesão**

	Grupo 1	Grupo 2
	23,4	42,2
	39,6	37,8
	31,4	35,6
	32,6	40,0
<b>Média</b>	<b>31,7</b>	<b>38,9</b>

\*p < 0,05

Os dados obtidos da figura acima estão plotados no gráfico abaixo onde se pode observar a média e a variância dos resultados dos grupos 1 e 2, no terceiro dia após indução da lesão.



**Fig. 23** Gráfico comparativo da média de macrófagos entre os grupos - 3 dias, indicando valor máximo, mínimo e a média.

TABELA 10 - Número de macrófagos: 7 dias após a lesão

	Grupo 1	Grupo 2
	30,6	26,2
	43,6	48,2
	35,8	22,4
	10,4	16,6
<b>Média</b>	<b>30,1</b>	<b>28,3</b>

\*p< 0,05

Os dados obtidos da figura acima estão plotados no gráfico abaixo onde se pode observar a média e a variância dos resultados dos grupos 1 e 2, no sétimo dia após indução da lesão.

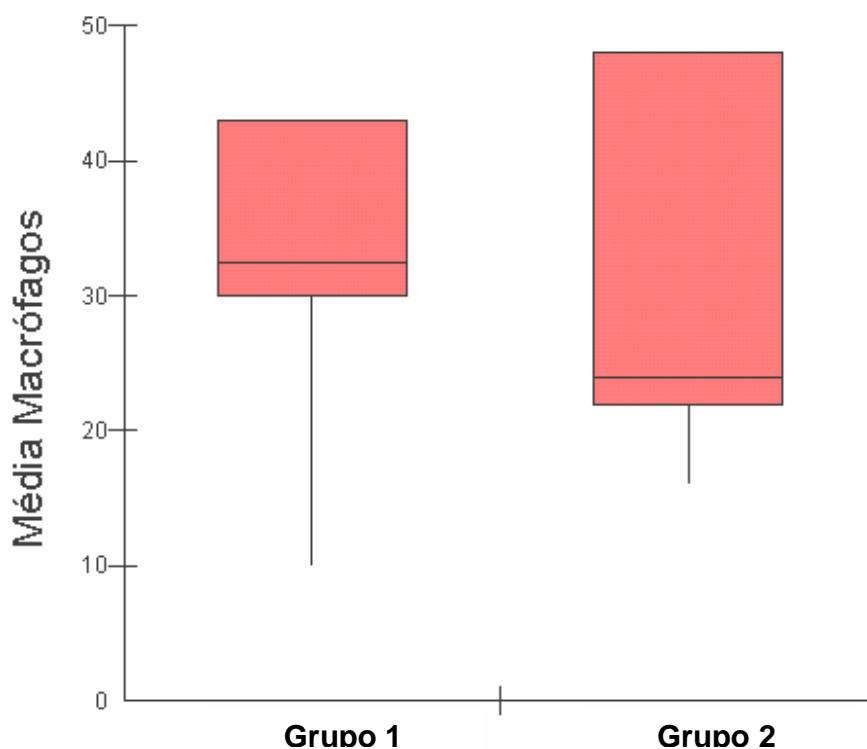


Fig. 24 Gráfico comparativo da média de macrófagos entre os grupos - 7 dias, indicando valor máximo, mínimo e a média

Tabela 11 - Número de macrófagos: 14 dias após a lesão

	Grupo 1	Grupo 2
	30,8	15,0
	20,2	25,6
	18,6	17,2
	28,8	25,8
Média	24,6	20,9

\*p> 0,05

Os dados obtidos da figura acima estão plotados no gráfico abaixo onde se pode observar a média e a variância dos resultados dos grupos 1 e 2, no décimo quarto dia após indução da lesão.

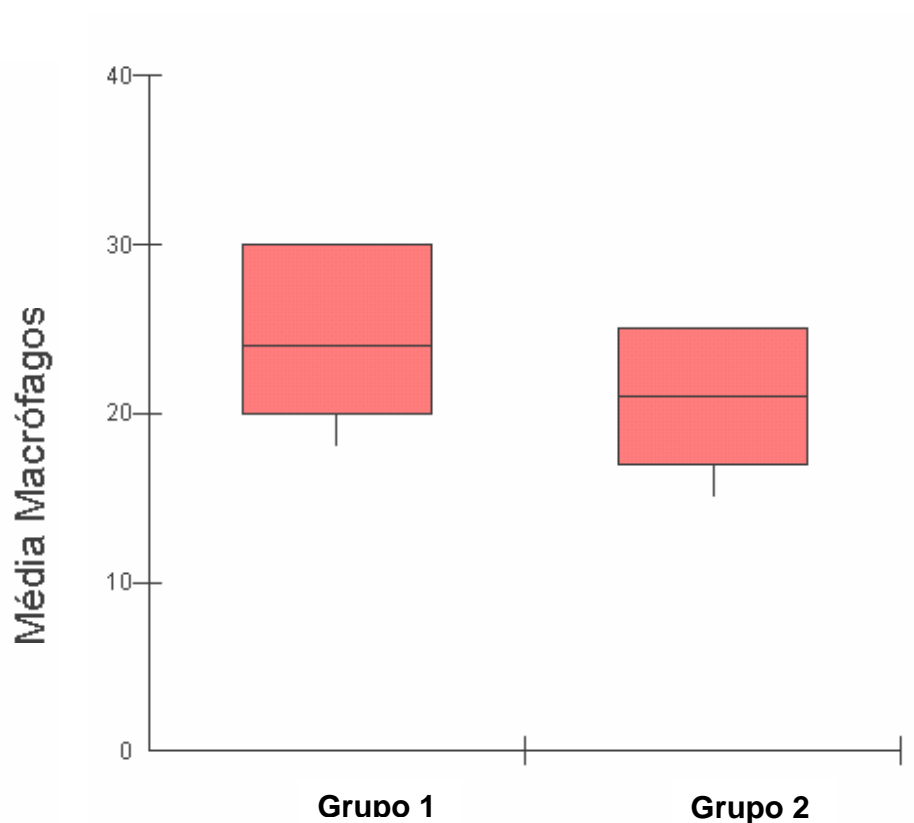


Fig. 25 Gráfico comparativo da média de macrófago entre os grupos - 14 dias, indicando valor máximo, mínimo e a média.



TABELA 12 - Percentual total de macrófagos – comparativo entre os dias

	Grupo 1	Grupo 2
3 dias	31,7	38,9
7 dias	30,1	28,3
14 dias	24,6	22,3

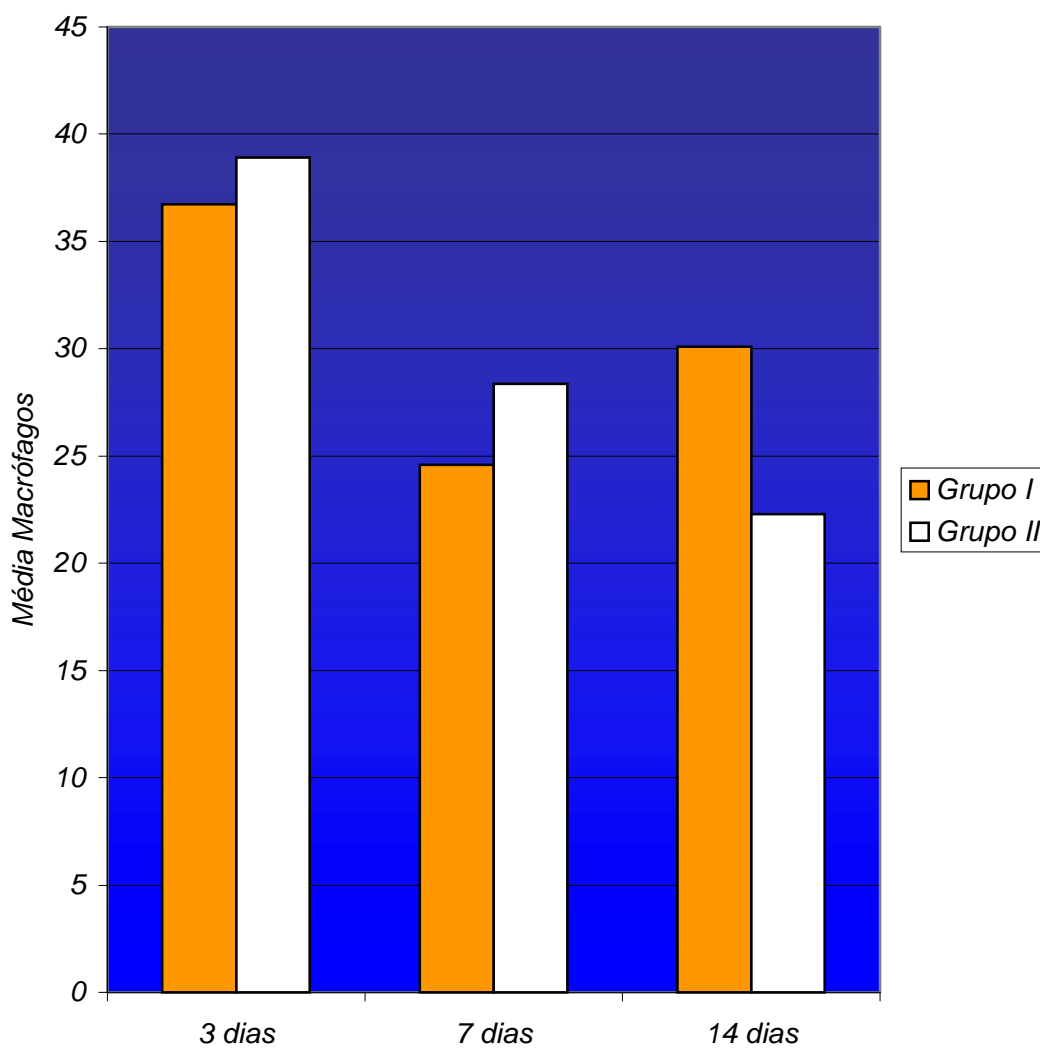


Fig. 26 Gráfico comparativo das médias de macrófagos entre os dias

Os dados obtidos na Tabela 10 foram submetidos ao teste de "Tukey" tomando como princípio que as médias dos grupos 1 e 2 representadas pelas mesmas letras não são significantes estatisticamente.

**Tabela 13 - Teste "Tukey" para a variável: " Macrófagos" Grupo 1**

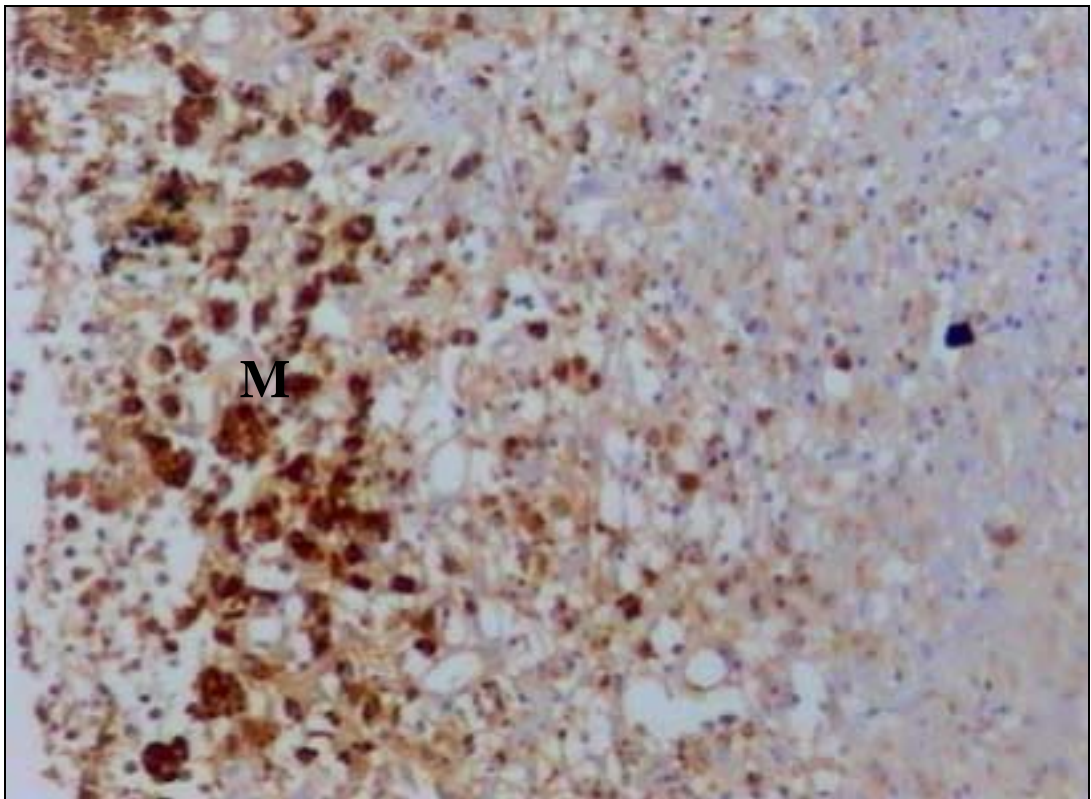
Trat = Grupo 1			
Dias	N	Macrófagos	Grupo
14	4	31.7	a
7	4	30.1	a
3	4	24.6	a

g.l = 12 qme = 6.559 alfa = 0.05 \* médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes

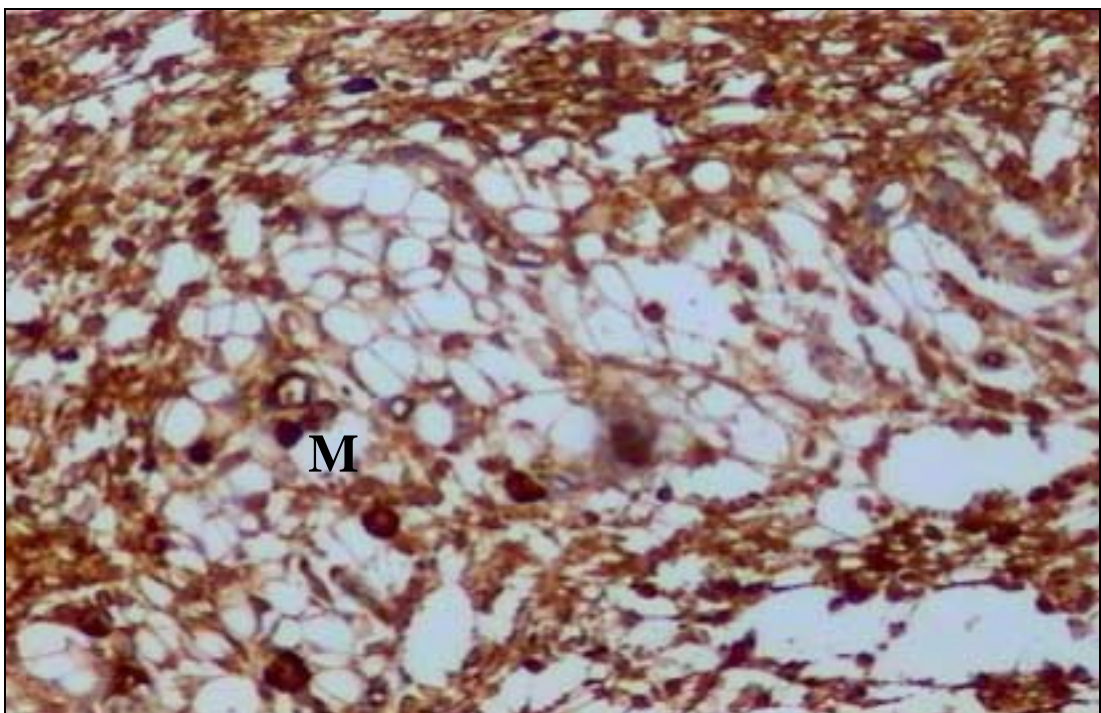
**Tabela 14 - Teste "Tukey"- para a variável: " Macrófagos" Grupo 2**

Trat = Grupo 2			
Dias	N	Macrófagos	Grupo
14	4	38.9	a
7	4	28.3	a b
3	4	20.9	b

g.l = 12 qme = 6.559 alfa = 0.05 \* médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes

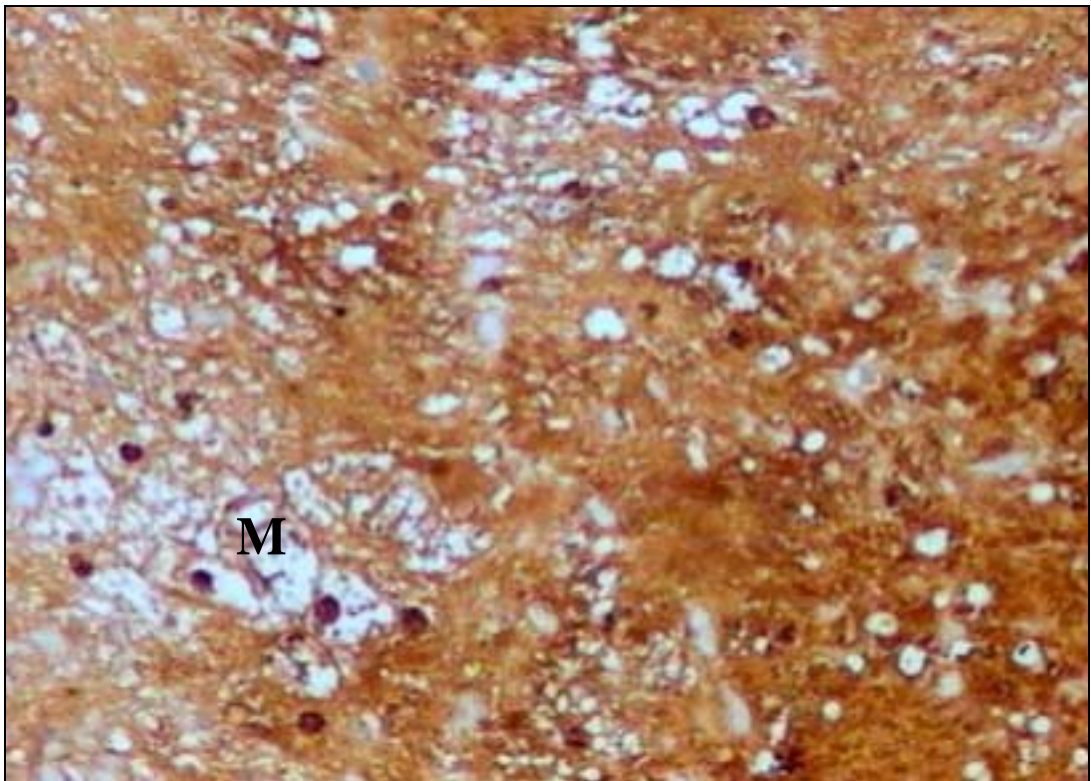


**Fig. 27** Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro ( M ), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 1 ( animais diabéticos) 3 dias aumento de 200X.

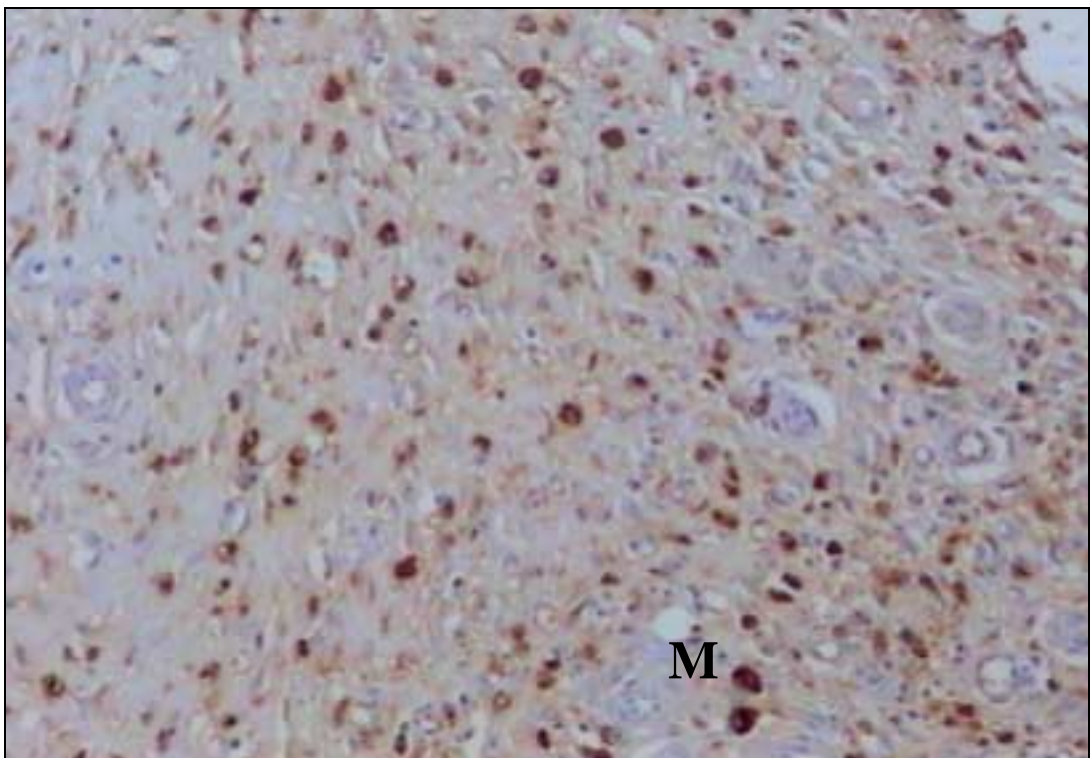


**Fig. 28** Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro ( M ), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 ( animais não diabéticos ) 3 dias aumento de 200X

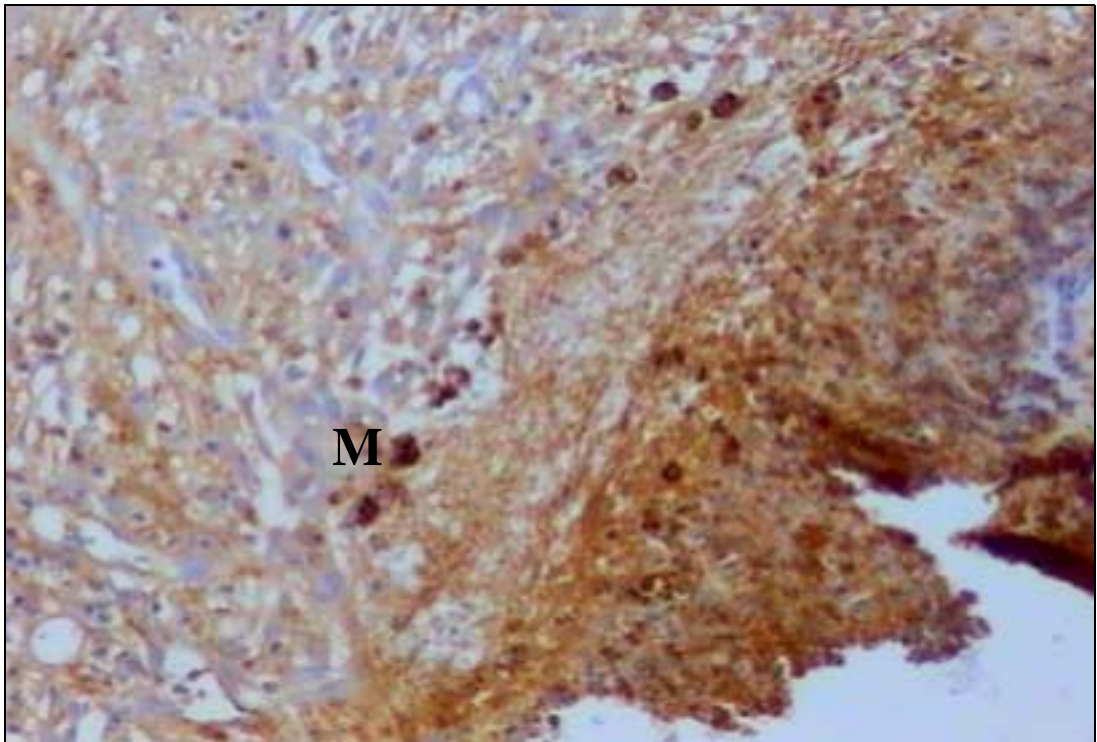




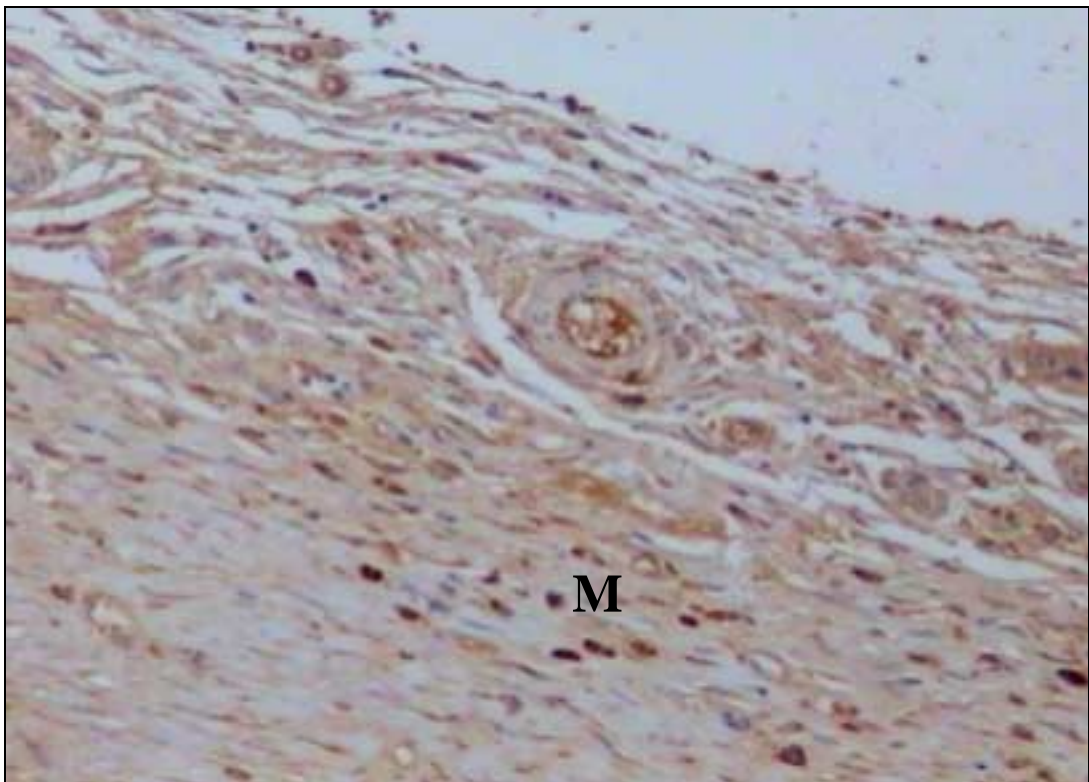
**Fig. 29** Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 (animais não diabéticos ) 7 dias aumento de 200X .



**Fig. 30** Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 1 ( animais diabéticos) 7dias aumento de 200X



**Fig. 31** Fotomicrografia mostrando concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56, grupo 1 ( animais diabéticos) 14 dias aumento de 200X.



**Fig. 32** Fotomicrografia mostrando diminuição da concentração de macrófagos, núcleos corados em marrom escuro (M), lâmina imunohistoquímica HAM 56 grupo 2 (animais não diabéticos )14 dias aumento de 200X

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi idealizado com o objetivo de construir um protocolo em relação à quantificação das áreas representativas de colágeno e macrófagos em lesões de animais Diabéticos Aloxânicos e Não Diabéticos. Diante das evidências de que ocorrem falhas no reparo tecidual dos animais diabéticos, asseveradas pela revisão bibliográfica.

Como modelo experimental escolheu-se o rato Wistar, considerando sua fácil obtenção, manuseio, e principalmente pelas características positivas apresentadas durante a instalação do diabetes.

A distribuição dos animais em dois grupos experimentais permitiu analisar comparativamente a cicatrização de lesões cutâneas.

O período estabelecido para a avaliação foi de 3, 7 e 14 dias, haja vista que durante estes períodos se concentram grande parte dos eventos estudados neste trabalho.

A deficiência de insulina determina no organismo, o aparecimento da síndrome do diabetes mellitus, um estado patológico caracterizado clinicamente por hiperglicemia e pela tríade, polidipsia, polifagia e poliúria (GANONG, 1983; CHACRA, 1986).

As complicações metabólicas observadas no organismo privado de insulina traduzem basicamente, o elevado grau de dependência dos diversos órgãos ao hormônio.

A densidade dos sítios celulares de interações para insulina ao nível de membrana plasmática varia em função da concentração do hormônio



---

circulante, estando aumentada em condições de hiperinsulinemia (jejum, hipofisectomia, diabetes espontâneo) e diminuída frente a hiporinsulinemia. (FREYCHET, 1976; KAHN, 1976; GOLDFINE, 1978.)

A síndrome de deficiência insulínica pode ser obtida cirurgicamente ou pela administração de fármacos diabetogênicos tais como a aloxana e a estreptozotocina, confirmado por vários autores (CALVO et al.,1979; OLIVEIRA-FILHO et al., 1986; GOTH et al., 1957; ROSENTHAL et al., 1962).

Optou-se pela utilização da aloxana devido às características apresentadas serem semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos. Tais como: glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, hiperlipemia entre outras. O diabetes aloxânico tem demonstrado sinais clássicos do diabetes humano (RERUP, 1970).

Os animais deste estudo quando submetidos à administração endovenosa da aloxana apresentaram uma taxa de 60,41 % de resposta ao aloxana, perfazendo uma média glicêmica de 281,0 mg/dl como demonstra a Tabela 2.

Como consequência de uma série de complicações (déficit do metabolismo intermediário dos hidratos de carbono, lipedes e proteínas e de alterações do metabolismo hídrico e eletrolítico), o rato diabético apresenta distúrbios no crescimento, no ganho de massa corporal e evolui com perda de peso corporal (GANONG, 1983; OLIVEIRA-FILHO et al.,1986).

Nossos resultados também corroboram com estes achados sendo que os animais diabéticos apresentaram perda de peso em média 9,6 % o que pode ser visualizado na Tabela 1, similares aos resultados encontrados na literatura.(LIU & LIN, 1969; HIGH et al.,1985).

A reação inflamatória é um processo dinâmico que tem início em seguida a uma lesão subletal de algum tecido e termina com a cura completa

---

do sítio lesado. Embora às vezes considerado como uma entidade isolada, o processo inflamatório se compõe de diversas partes interatuantes, cada uma delas aparentemente não relacionada com as outras (RYAN & MAJNO, 1977).

Podemos enumerar estes eventos em três fases: inflamação, proliferação fibroblástica e maturação/remodelação como descrito pelos autores acima os eventos se superpõem e interdepende, uns dos outros, portanto, no caso do diabetes toda seqüência fica comprometida culminando no retardo das fases de maturação/remodelagem.

Os estudos de FAHEY; SMOLLER; SHIRES (1991) e CUTLER et al., (1991), que descrevem modificações nas funções leucocitárias dos polimorfonucleares nos leitos da feridas de ratos diabéticos, confirmam o retardo na reparação tecidual.

Após a indução cirúrgica das lesões cutâneas, acompanhou-se o reparo no terceiro, sétimo e décimo quarto dias para verificarmos as alterações de colágeno, assim como, do número de macrófagos. As amostras retiradas dos dois grupos experimentais foram coradas pelo tricrômico de masson tendo em vista ser este tipo de coloração uma das mais utilizadas para evidenciar fibras colágenas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995)

Neste trabalho foi realizado também, estudo imunohistoquímico que devido a sua especificidade, permitiu a identificação e quantificação dos macrófagos contribuindo para o estudo da ação destas células na cicatrização das feridas cutâneas.

O método utilizado para marcar o anticorpo foi conjugação por enzima. A enzima usada foi a peroxidase, localizada por intermédio da 3-3' diaminobenzidina (DAB), o antígeno macrofágico CD 68 encontrado no citoplasma do macrófago foi detectado pelo anticorpo monoclonal HAM56. Para que esta reação tornasse visível foi utilizado o revelador da reação –



DAB, que corou os macrófagos em marrom escuro. (HSU, et al 1981; GOWN, et al., 1993; BOSMAN, 1992).

Para a quantificação das áreas representativas de colágeno e macrófagos, foram digitalizados 5 (cinco) campos por lâmina. Todas as imagens digitalizadas foram padronizadas quanto a intensidade de luz do microscópio e altura do condensador. Para cada imagem quantificada, calculou-se então, a área ocupada e a quantidade de luz absorvida pelo colágeno e pelos macrófagos em cada um dos campos.

A escolha de 5 ( cinco) campos neste tipo de trabalho nos proporcionou uma margem de segurança maior em relação aos resultados, considerando que o método de digitalização de imagem utilizado para a quantificação de colágeno e macrófagos podem não ser representativos quando da utilização de apenas um campo.

A quantidade de absorção de cor é determinada através da soma de todos os valores de cor dos pixels que formam a estrutura segmentada. Com isso, não só leva-se em consideração a área ocupada pela estrutura segmentada, mas também quantifica-se a luz absorvida pela estrutura (SCHALKOFF, 1989).

Os resultados obtidos no Grupo 1, após 3 (três) dias da indução das lesões demonstram menores índices na porcentagem de colágeno e macrófagos quando comparados com seu respectivo controle ( Grupo 2 )como pode ser verificado nas (Tabelas 3 e 7.)

A literatura demonstra que nos primeiros dias os eventos de reparo estão direcionados para a prevenção de perda subsequente de sangue, ou seja, a hemostasia e formação de um trombo que fornece matriz preliminar

para os processos seguintes, onde as plaquetas aderem ao colágeno no espaço perivascular.

Este contato anteriormente descrito ativa as plaquetas que liberam fatores plaquetários que aceleram a migração e proliferação da principal célula do processo cicatricial, o fibroblasto.

Dando continuidade a este processo, segue-se a vasodilatação o aumento da permeabilidade vascular, e a seguir os monócitos migram para dentro da ferida. Os monócitos ingerem material e transformam-se em macrófagos que fagocitam os detritos e bactérias. (LEIBOVICH & ROSS, 1976).

A hipótese de que os macrófagos apenas controlavam a infecção foram ampliados, eles desempenham importante papel na reparação tecidual e na síntese de colágeno. Neste contexto fica claro que a resposta inflamatória deficiente, assim como a diminuição dos fibroblastos na ferida, reduz em muito a deposição do colágeno. (LEIBOVICH & ROSS, 1976; SIMÕES et al., 1985).

NISHIGAKI (1989), estudando o processo de cicatrização em ratos diabéticos, constatou que a resposta inflamatória foi insignificante, havendo incompleta formação de redes de fibrina, retardamento da epitelização, reduzida atividade fibroblástica, e baixa produção de colágeno.

Os trabalhos citados acima corroboram os resultados alcançados pelo nosso trabalho nos três primeiros dias após a lesão onde o grupo Diabético (Grupo 1) apresentou níveis tanto de colágeno bem como macrófagos inferiores que o grupo controle (Grupo2).

Também foram observados os resultados obtidos no sétimo dia após a lesão sendo que, os animais objetos deste estudo apresentaram aumento da porcentagem de fibras colágenas isto pode ser observado na (Tabela 4),

Outro fato marcante ocorrido no sétimo dia após a lesão foi a diminuição do número de macrófagos em ambos os grupos, entretanto, no grupo controle (Grupo 2) o decréscimo foi mais marcante totalizando 10,55 % contra 7,15% do Grupo1. (TABELA 8).

YOUNG (1988) afirma que durante a fase proliferativa o número de macrófagos diminui, enquanto o número de células endoteliais e fibroblastos aumenta. Estes últimos são de grande importância no reparo de pele não só porque são os principais produtores da matriz extracelular, mas também por que se contraem, reduzindo o tamanho da lesão.

GUIDUGLI-NETO (1987) descreve o tecido de granulação que começa a ser formado por volta do quarto dia após a lesão, e composto de um leito denso de macrófagos, fibroblastos e neovasos suportados por uma matriz de fibronectina, colágeno tipo I e tipo II, além de ácido hialurônico.

Vários estudiosos também reportam que animais diabéticos aloxânicos produzem menos tecido de granulação que ratos normais mesmo quando submetidos à influência de hormônios de crescimento aplicados localmente. As cicatrizes nestes animais demonstram fraca resistência mecânica, podendo estas alterações ser atribuídas às alterações bioquímicas no local da lesão causadas pela síndrome da deficiência de insulina. NAGY; REDEI; KARADY, (1961); ROSENTHAL et al. (1962).

GRANDINI (1978) também relata que ratos diabéticos apresentam retardo na reparação e que estas diferenças foram observadas principalmente na diferenciação dos fibroblastos quando comparados aos grupos controles. Outros autores Também relatam estes defeitos no processo de reparo atribuindo os mesmos ao déficit na formação de colágeno (GOODSON & HUNT, 1979; SCHNEIR et al., 1979; BOWERSOX, 1986; NISHIGAKI, 1989).

GARCIA-LEME (1981) e CORREIA & PIRES (1988) atribuem estes defeitos no processo de reparação a diminuição ou ausência de insulina, descrevendo que a mesma atua como hormônio pró-inflamatório.

Em nosso estudo os animais dos dois grupos analisados aos 14 dias demonstraram aumento na porcentagem de fibras colágenas em relação ao sétimo dia e também mantiveram os índices relativos entre os grupos, ou seja, a porcentagem de fibras colágenas nos animais diabéticos é inferior ao seu grupo controle (TABELA.5) Observou-se também uma desaceleração no aumento de fibras colágenas nos animais do Grupo 2, o que se justifica pelo estado adiantado no reparo destas lesões, pois a literatura demonstra que a partir do 14º dia a proliferação celular diminui com redução gradual do número e tamanho dos fibroblastos. (PEACOK, 1984). Concomitante há um lento aumento na resistência elástica da ferida, pois as fibras colágenas sofrem maior interligação aumentando sua espessura e compactação (CLARK, 1985).

Quanto ao percentual de macrófagos observou-se uma redução maior no grupo 2 em relação ao grupo 1, pois nesta etapa a lesão do grupo controle (TABELA 9) vai avançado em seu processo de maturação e os macrófagos são cada vez mais escassos.

Estes dados mostraram que a espectrofotometria é um instrumento preciso e abrangente para avaliar a cicatrização de lesões cutâneas em ratos diabéticos (aloxânicos). Utilizamos como parâmetro à análise do percentual de fibras colágenas e de macrófagos que foram avaliadas por procedimentos estatísticos que contemplaram aspectos de validação, significância e reprodutibilidade do protocolo.

## **6 CONCLUSÃO**

**Podemos concluir que:**

- **O protocolo de avaliação da cicatrização de lesões em ratos diabéticos utilizando o espectro da cor de fibras colágenas e macrófagos mostrou-se eficaz.**
- **Que a porcentagem de fibras colágenas e macrófagos podem ser facilmente analisadas pelo espectro de cor.**

## 7 ANEXOS

## Protocolo de fibras colágenas grupo 1

Amostr a	Grupo Dias	% de Fibras Colágenas					Média
		Campo I	Campo II	Campo III	Campo IV	Campo V	
01	G 1 / 3	23,10	17,15	22,20	19,10	14,15	19,14
02	G 1 / 3	10,40	16,80	14,60	14,40	9,00	13,04
03	G 1 / 3	5,60	17,90	14,60	19,40	14,00	14,30
04	G 1 / 3	24,50	11,10	26,80	13,10	10,70	17,24
05	G 1 / 7	23,10	17,40	26,30	19,00	13,70	19,90
06	G 1 / 7	24,40	15,00	17,90	11,90	18,70	17,58
07	G 1 / 7	20,10	21,50	19,80	21,40	21,70	20,90
08	G 1 / 7	20,05	28,15	29,00	12,20	16,00	21,08
09	G 1 / 14	23,40	21,50	20,10	24,60	23,40	22,60
10	G 1 / 14	23,80	24,40	23,80	24,60	25,10	24,34
11	G 1 / 14	20,20	18,30	19,20	19,50	20,00	19,44
12	G 1 / 14	25,70	27,30	24,30	26,70	27,30	26,26

## Protocolo de fibras colágenas grupo 2

Amostr a	Grupo Dias	% de Fibras Colágenas					Média
		Campo I	Campo II	Campo III	Campo IV	Campo V	
01	G 2 / 3	24,90	26,60	6,60	13,70	11,00	16,56
02	G 2 / 3	11,20	22,90	21,00	20,70	21,60	19,48
03	G 2 / 3	21,20	19,10	35,70	18,40	16,30	22,14
04	G 2 / 3	14,40	35,40	12,50	15,70	25,00	20,60
05	G 2 / 7	40,10	22,40	19,10	29,10	31,20	28,38
06	G 2 / 7	21,60	17,30	27,70	19,00	24,90	26,10
07	G 2 / 7	38,00	18,50	23,50	22,70	16,20	23,78
08	G 2 / 7	41,30	28,70	19,00	29,10	14,20	26,47
09	G 2 / 14	30,00	31,70	31,70	22,50	27,10	28,60
10	G 2 / 14	40,50	10,20	30,30	43,80	23,60	29,68
11	G 2 / 14	30,00	37,30	28,10	33,20	26,70	31,06
12	G 2 / 14	32,70	29,20	38,30	50,60	33,50	36,86

## Protocolo de macrófagos grupo 1

Amostr a	Grupo Dias	% de Macrófagos					Média
		Campo I	Campo II	Campo III	Campo IV	Campo V	
01	G 1/ 3	25	19	37	18	18	23,40
02	G 1/ 3	45	58	25	39	31	39,60
03	G 1/ 3	33	45	39	21	19	31,40
04	G 1/ 3	32	44	30	24	33	32,60
05	G 1/ 7	21	45	17	41	29	30,60
06	G 1/ 7	67	18	27	55	51	43,60
07	G 1 / 7	36	97	17	14	15	35,80
08	G 1/ 7	08	08	12	15	09	10,40
09	G 1/ 14	21	45	17	42	29	30,80
10	G 1/ 14	24	17	24	19	17	20,20
11	G 1/ 14	15	22	28	08	20	18,60
12	G 1/ 14	52	17	23	28	24	28,80

## Protocolo de macrófagos grupo 2

Amostr a	Grupo Dias	% de Macrófagos					Média
		Campo I	Campo II	Campo III	Campo IV	Campo V	
01	G 2/ 3	52	65	46	25	23	42,20
02	G 2/ 3	54	31	50	31	23	37,80
03	G 2/ 3	43	25	29	65	16	35,60
04	G 2/ 3	53	49	34	28	36	40,00
05	G 2/ 7	21	29	23	26	32	26,20
06	G 2/ 7	37	39	60	77	28	48,20
07	G 2/ 7	17	13	17	19	46	22,40
08	G 2/ 7	17	21	15	13	17	16,60
09	G 2/ 14	26	09	08	21	11	15,00
10	G 2/ 14	23	25	29	25	26	25,60
11	G 2/ 14	20	17	17	05	27	17,20
12	G 2/ 14	39	19	34	15	22	25,80

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANEGA, A. Análise microbiológica de feridas infectadas após extração dental em ratos diabéticos não controlados. 1999, 168 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

ASAYAMA, K. et al. Chemoluminescence as an index of drug-induced free radical production in pancreatic islets. *Diabetes*, v. 33, p. 160–163, 1984.

BOSMAN, F. T. Histochemical techniques for receptor ization: prog. histochem. *J. Histochem. Cytochem*, v. 26, n. 1, p. 30-38, 1992.

BOWERSOX, J. C. In vivo collagen metabolism in spontaneously diabetic (db/db) mice. *Experimental and Molecular Pathology.*, v. 45, p. 221-226, 1986.

CALVO, J. C. et al. NADPH generating enzymes in lyedy cells from diabetic rats. *Horm. Metab. Res.*, v. 11, n. 2, p. 161-164, 1979.

CARPENTIER, J. L. et al. Lysosomal association of internalized 125I- insulin in isolated rat hepatocytes: direct demonstration by quantitative electron microscopie autoradiography. *J. Clin. Invest.*, v. 63, n. 6, p. 1249-1261, June 1979.

CHACRA, A. R. Etiopatogenia do diabetes mellitus. *R. da Assoc. Med. Bras.*, , v. 32, n. 11/12, p. 187-190, nov./dez. 1986.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 13, p. 701-725, 1985.

CLARK, R.A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J. Invest. Dermatol.*, v. 11, n. 4, p. 647-661, Oct. 1993.

CORRÊA, M. S. N. P. Alterações induzidas pelo diabetes insulino-dependente na glândula submandibular do rato. 1988, Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CRAWFORD, J. M.; COTRAN, R. Pâncreas. In: COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 816-830.



CUTLER, C. W. et al. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient: a case report. *J. Periodontol.*, v. 62, n. 6, p. 394-401, 1991.

DUARTE, A. C. G. O. Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultrasônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico. 1996. Dissertação ( Mestrado em Bioengenharia ) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ECHERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. *British Medical Bulletin*, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

FAHEY, T.J.; SMOLLER, B.; SHIRES, G. T. Diabetes impairs the inflammatory response to wound healing. *J. Surg. Res.*, v.50, n.4, p.308-13, 1991.

FLATT, P. R. et al. Defective insulin secretion in diabetes and insulinoma. London: Portland Press, 1992.

FORREST, J. C. et al. Tape-closed and sutured wounds: a comparison by tensiometry scanning electron microscopy. *Br. J. Surg.*, v. 57, p. 729-736, 1970.

FREYCHET, P. Interactions polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: studies with insulin and glucagon. *Diabetologia*, v. 12, n. 2, p. 83-100, may 1976.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. *Experientia*, v. 27, n. 5, p. 549-550, 1970.

GAGLIARDINO, J. J. et al. Insulin binding to liver cells a: simple and useful in vivo model. *Horm. Met. Resp.*, v. 12, p. 300-303, 1980.

GANONG, W. F. Fisiologia médica. São Paulo: Atheneu, 1983.

GARCIA-LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. *Gen. Pharmacol.*, v. 12, n. 1, p. 15-24, 1981.

GILMAN, L.; GOODMAN, S. The pharmacological basics of therapeutics. 5<sup>th</sup> ed. New York: MacMillian Publishine, 1975.

GOLDFINE, I. D. Does insulin need a second messenger. *Diabetes*, v. 26, n. 2, p. 148-55, feb. 1977.

\_\_\_\_\_. Insulin receptors and the site of action insulin. *Life Sci.*, v. 23, n. 27/28, p. 2639-2648, dec. 1978.

**GOODSON, W. H.; HUNT, T. K.** Studies of wound healing and diabetic patient. *Surgical, Gynecology and Obstetrics*, v. 149, p. 600-608, 1979.

**GORUS, F. K., MALAISSE, W. J.; PIPELEERS, D. G.** Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem. J.*, n. 208, p. 513-551, 1982.

**GOTH, A.; NASH, W. L.; NAGLER, M. et al.** Inhibition of histamine release in experimental diabetes. *Amer. J. Physiol.*, n. 191, p. 25-28, 1957.

**GOWN, A. M.; WEVER, N.; BATTIFORA, H.** Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.*, n. 1, p. 256-266, 1993.

**GRAHAM, M. F.; DIEGELMANN, R. F.; COHEN, I. K.** Effects of inflammation on wound healing: In vitro studies. In: HUNT, T. K.; HEPPENSTALL, R. B.; PINES, E. *Soft and hard tissue repair: biological and clinical aspects*. New York: Hardcover, 1984. p. 158-83.

**GRANDINI, S. A.** The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction: histologic study in rats. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.*, v. 45, n. 2, p. 190-199, 1978.

**GUIDUGLI-NETO, J.** The effect of roentgen radiation on the capillary sproutsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo, São Paulo*, v. 1, p. 6-8, 1987.

\_\_\_\_\_. The effect of roentgen radiation on the capillary sproutsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo, São Paulo*, v. 6, p. 66-71, 1992.

**GUYTON, A. C.; AALL, J. E.** *Tratado de fisiologia médica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

**HERSON, P. S.; ASHFORD, M. L. J.** Activation of a novel non-selective cation channel by alloxan and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the rat insulin-secreting cell line CRI-G1. *J. Physiol.*, v. 501, p. 59-66, 1997.

**HIGH, A. S.; SUTTON, J.; HOPPER, A. H.** A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocina-induced diabetic rats. *Arch. Oral. Biol.*, v. 30, n. 9, p. 667-671, 1985.

**HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and untabeled (PAD) procedure. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 29, p. 557-580, 1981.

**HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G.** Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degradation. *Biochem J.*, v. 184, p. 643-650, 1979.

**JOHNSTON, D. E.** Wound healing in skin. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 20, n. 1, p. 01-25, 1990.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KAHN, C. R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J. Cell Biol., v. 70, n. 2, p. 261-286, aug. 1976.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I. A.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis- effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery, v. 90, p. 262-270, 1981.

LACERDA, S. N. Diabetes mellitus. São Paulo: Pirâmide, 1988.

LEE, D.; WILLIAMS, R. H. Intracellular ization of labeled thyroxine and labeled insulin in mamma - lian liver. Endocrinology, v. 54, p. 5-19, 1954.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. A macrophage dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblast *in vitro*. Am. J. Patho., v. 84, n. 3, p. 501-508, 1976.

LERNMARK, A. Molecular biology of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus, Diabetologia, v.28, n. 4,p.195-203, 1985.

LIU, F. T. Y.; LIN, H. S. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. J. Dent. Res., v. 48, n. 4, p. 559-567, july/aug. 1969.

MAJNO, G.; JORIS, I. Cells, tissues and disease: principles of general pathology. EUA: Blackwell Science, 1996.

McKEE, P. H. et al. Pathology of the skin with clinical correlations. Philadelphia: Lippincott Company, 1989.

McKINNEY, P.; CUNNINGHAM, B. L. Wound healing: handbook of plastic surgery. : Baltimore MD: Williams & Wilkins, 1989.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 85, p. 4894-4897, 1988.

NAGY, S.; REDEI, A.; KARADY, S. Studies on granulation tissue production in alloxan-diabetis rats. J. Endocrinol., v. 22, p. 143-6, apr. 1961.

NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. J. Exp. Med., v. 156, p. 430-442, 1992.

NISHIGAKI, A. Experimental studies of skin wound healing process by first intention in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. Shikwa Gakwho, v. 89, n. 4, p. 793-822, apr. 1989.

NOLASCO, M. A. Efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a cicatrização da pele de ratos diabéticos. 1993, Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos.

**OLIVEIRA FILHO, R. M. et al. Age-related changes in the diabetic alterations of the hypophysis-thyroid testicular axis in male rat. Arq. Bras. Endocrin. Metabol., v. 30, n. 2, p. 40-43, 1986.**

**OTTLECZ, A.; KOLTAI, M.; DEKOV, E. Effect of insulin and inflammation in rats. Int. Arch. Allergy Appl. Immun., v. 50, n. 5, p. 548-554, 1976.**

**PEACOCK JR., E. E. The wound repair. Philadelphia: W B Saunders, 1984.**

**RAISER, A. G. Patologia cirúrgica veterinária. Santa Maria: Univ. Fed. de Santa Maria, 1995. v.1**

**RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol. Rev., v. 22, p. 485-518, 1970.**

**ROBBINS, S. L. et al. Patologia estrutural e funcional. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.**

**ROSENBERG, C. S. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. Nurs. Clin. North Am., v. 25, n. 1, p. 247-261, 1990.**

**ROSENTHAL, S. et al. Relation of strength to composition in diabetic wounds. Surgery Gynecology and Obstetrics, v.4, n.9, p. 437-442, 1962.**

**RUDOLPH, R.; BALLANTYNE JR., D. L. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G.; MAY JR., J. W.; LITTLER, J. W. Plastic surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1990. v.1**

**RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation: a review. Am. J. Pathol., v. 86, , p. 185-276, 1977.**

**SCHALKOFF, R. J. Digital image processing and computer vision. New York: Wiley, 1989.**

**SCHMIDT MI, et al. Variation in glucose tolerance with ambient temperature. Lancet, v. 15, n. 344 p.1054- 1055, 1994.**

**SCHNEIR, M. et al. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes: tissue specific effects on collagen metabolism. Biochim. Biophys. Acta., v. 583, n. 1, p. 95-102, 1979.**

**SIEGEL, S.; CASTELLAN,JR., N. J. Nonparametric statistics. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1988.**

**SIMÕES, M. J. et al. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. Rev. Paul. Med., v. 103, n.3, p. 123-126, 1985.**

**SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. J. Clin. Inv., v. 51, p. 2009-2023, 1972.**

TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *Am. J. Pathol.*, , v. 138, p. 1307-1313, 1991.

TOGNINI, J. R. F. et al. Estudo comparativo entre a sutura contínua e a com pontos separados na parede abdominal de ratos. *Acta Cir. Bras.* , v. 12, p. 249-254, 1997.

WILSON J. D.; FOSTER, D. W. *Williams: tratado de endocrinologia*. São Paulo: Manole, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and complications. Report of WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of *diabetes mellitus*,1999.

YAMAMOTO, N.; HOMMA, S.; MILLMAN, I. Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. *J. Immunol.*, , v. 147, p. 237-280, 1991.

YOUNG, SR.; The effect of therapeutic ultrasound on the biological mechanisms involved in dermal repair. (PhD thesis) University of London. 412p.1988.