

IRIA MARISA GEVARTOSKY

ESTUDO HISTOLÓGICO DOS EFEITOS DE TRÊS DROGAS
ANTIBIÓTICAS SOBRE A EVOLUÇÃO DO TECIDO DE
GRANULAÇÃO INDUZIDO EM RATOS, POR MEIO DA
IMPLANTAÇÃO DE ESPONJA.

*Exemplar corrigido de acordo com a Resolução CCPB/
036/83*
[Assinatura]

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campi-
nas, para a obtenção do Grau de
Mestre em Odontologia (Bases
Farmacológicas para a Terapêu-
tica Medicamentosa)

PIRACICABA
1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais HEITOR e ERMÍNIA, que me proporcionaram a oportunidade de nascer e chegar até aqui, ensinando-me a lutar pelos meus ideais, dedico esta conquista com profunda admiração e respeito.

Aos meus irmãos MARINA , HEITOR , FERNANDO e MARILDA ,
pela companhia , incentivo e amizade sempre presentes.

À Profa. Dra. MARIA DE LOURDES G. DA GAMA,
pela orientação constante, segura e amiga
que muito contribuiu para esta pesquisa,

... minha gratidão,
amizade e imenso
carinho.

Ao Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO VIZIOLI,
pela orientação sábia, segura e
valiosa neste trabalho,

... meu reconhecimento,
agradecimento e respeito.

Ao Prof. Dr. SAMIR TUFIC ARBEX, Coordenador
Geral dos Cursos de Pós-Graduação e Coordenador
do Curso de Pós - Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba , pela
amizade e atenção,

... meus agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOSÉ ARISTODEMO PINOTTI , Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo incentivo àqueles que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS NEDER , Digníssimo Coordenador Geral da UNICAMP, pelo muito que tem feito em prol do ensino e da pesquisa em nossa faculdade.

Ao Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI , ilustre Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo estímulo ao trabalho científico.

Ao Prof. Dr. AMADO LEONÍZIO AZEVEDO , pela colaboração e amizade durante todo o curso.

Aos Profs. da Área de Farmacologia: JOSÉ RANALI, EDUARDO DIAS DE ANDRADE, THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, JOÃO LEONEL JOSÉ, JONAS VAZ ARRUDA , pelos ensinamentos recebidos durante o curso.

Ao Prof. Dr. MOUSTAFA MOHAMED EL GUINDY , mestre e amigo, pelos ensinamentos dos primeiros passos na vida científica.

Aos demais professores, a minha gratidão pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

À amiga LOURDES CATARINA DA SILVA, que com sua presença, tomou mais agradável a realização deste curso.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência, companheirismo, carinho e amizade em todos os momentos.

À amiga NEIDE YOSIKO SAKATA, pela sua amizade, incentivo e companheirismo sempre demonstrados.

À amiga e secretária do Curso de Pós Graduação, SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI, pela sua dedicação profissional e grande simpatia.

Ao Sr. ANTONIO KERCHES DE CAMPOS, Técnico de Laboratório da Área de Patologia, pelas excelentes preparações histológicas.

Ao Sr. MOISÉS JOSÉ MARIA DA SILVA, Técnico de Laboratório da Área de Farmacologia, pelos cuidados para com os animais utilizados nessa pesquisa.

Ao Sr. ADÁRIO CANGIANI, pelo capricho na elaboração e montagem da documentação fotográfica.

À equipe da Biblioteca da FOP , pela atenção dispensada e, particularmente à Sra. IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, nossos agradecimentos.

Aos funcionários da FOP , nossos agradecimentos pela dedicação, pela amizade e pelo simples convívio ao longo destes anos.

A todos aqueles que nos auxiliaram de forma sincera para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

Í N D I C E

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	2
2 - PROPOSIÇÃO	17
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Seleção dos Animais	19
3.2. Material Usado	19
3.3. Distribuição dos Animais em Grupos Experimen tais	20
3.4. Implantação das Esponjas	21
3.5. Administração de Drogas	21
3.6. Obtenção do Material para Estudo	23
3.7. Coloração com Hematoxilina-Eosina	23
4 - RESULTADOS	25
5 - DISCUSSÃO	39
6 - CONCLUSÕES	46
7 - RESUMO	48
8 - SUMMARY	50
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta vascular e celular dos tecidos circunjacentes a uma lesão ou destruição celular, caracterizando-se pelos seguintes sinais e sintomas: calor, dor, rubor e edema, como foram fixados por CELSO (Aulus Cornélius Celsus), enciclopedista romano que viveu de 30 a.C. até 50 d.C.

Os agentes responsáveis pela inflamação são extremamente variáveis. Ela constitui uma resposta básica do organismo e aparece em qualquer tecido. O alicerce da resposta inflamatória é sempre o mesmo, independente do tipo de agente responsável ou local de ocorrência. A natureza, duração e gravidade final de sua resposta são determinadas por fatores relacionados com o hospedeiro e o agente agressor, embora a sequência das reações observadas numa inflamação seja sempre a mesma, tais como: trauma, lesão tecidual, presença de mediadores químicos, sintomas e sinais inflamatórios.

A reparação da lesão representa a substituição, por células novas, de tecido morto ou lesado. Em certos tecidos, a reparação consiste em reposição de células parenquimatosas, onde a reconstituição é quase perfeita, o que já não acontece em outros casos, com a substituição de células mortas ou lesadas por células do tecido conjuntivo (fibroso), ocorrendo

perda das células funcionalmente ativas e acarretando diminuição da reserva funcional do tecido.

"Se, nessa fase reparatória, com um pequeno artifício deslocássemos as margens da ferida, veríamos que sob elas faz saliência grande número de minúsculos grânulos avermelhados e brilhantes. Os mesmos correspondem aos brotos capilares circundados pelos fibroblastos e por fibrilas colágenas recentemente constituídas. Devido a esse aspecto, tal tecido, é chamado de tecido de granulação" (BOGLIOLO, 1976). Dentro do processo de reparação do organismo animal, a formação deste tecido é, sem dúvida, de primordial importância.

"Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo, responsáveis pela formação do colágeno. Produzem também a maioria das glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos ácidos) do tecido de granulação, que permite a agregação do colágeno em feixes" (MAIA, 1981).

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

Entretanto, outros autores afirmam que os fibroblastos no tecido de granulação têm origem hematôgena, mormen-

te de monócitos. Na verdade, não existem provas que eliminem uma ou outra hipótese, mas é provável que ambas estejam corretas, tendo os fibroblastos do tecido de granulação as duas origens.

Através da injúria tecidual ou por meio da implantação de esponjas tem-se induzido artificialmente a formação de tecido de granulação, em animais de laboratório com o objetivo de se pesquisar a gênese e processos que levam a cura do animal.

Vários pesquisadores têm realizado experiências em torno da morfologia do colágeno, sua cronologia de síntese e maturação, bem como os aspectos bioquímicos e fisiopatológicos dos componentes estruturados que participam da formação do tecido de granulação (MADEEN & PEACOCK Jr., 1968; ROSS, 1968; Mc MINN & PRITCHARD, 1969; VIZIOLI, BOZZO & VALDRIGHI, 1972; VIZIOLI, 1973; BAZIN, PELLETTIER & DELAUNAY, 1973; COHEN, LEWIS & RESNIK, 1975; VIZIOLI, 1975; DELAUNAY & BAZIN, 1975; ENGLER & JAYLE, 1976; BAZIN, LE LOUS & DELAUNAY, 1976; VIZIOLI, BLUMEN & EL GUINDY, 1976; IM, FRESHWATER & HOOPES, 1976).

A síntese do colágeno no tecido de granulação é detectável a partir do terceiro dia de desenvolvimento. A partir daí, a atividade dos fibroblastos aumenta atingindo o máximo entre 14 e 20 dias. Isso foi constatado pelo método de radioautografia, utilizando-se prolina marcada, conforme trabalhos de LOWTHER *et alii* (1961); PROCKOP *et alii* (1962); MADEEN

& PEACOCK (1968). Estudos posteriores feitos por VIZIOLI (1975) demonstraram que a síntese do colágeno no tecido de granulação inicia-se a partir dos primeiros dias de seu desenvolvimento atingindo o pico entre 15 e 20 dias. Após a terceira semana, a atividade de síntese pelos fibroblastos cai drasticamente, atingindo níveis inferiores aos primeiros 10 dias.

"Como é sabido, os passos iniciais na formação do colágeno ocorrem, intracelularmente, nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso dos fibroblastos secretores. O material aí produzido é então transferido para as vesículas do aparelho de Golgi, ou então diretamente para o espaço extracelular. Moléculas de protocólágeno (precursores do colágeno) são lançadas pelas células para o exterior, onde se tornam visíveis pela polimerização que ocorre, ao que tudo indica, do lado externo da membrana celular, mas bem junto a ela. As moléculas de protocólágeno extracelulares tornam-se então agregadas tanto lateral quanto longitudinalmente, e formam fibrilas de colágeno, que por sua vez, unem-se em feixes de fibras que podem ser visualizadas ao microscópio óptico" (ANDRADE, 1980).

Quanto à substância fundamental, formada principalmente por um mucopolissacarídeo ácido (glicosaminoglicana), o ácido hialurônico, torna-se imprescindível à agregação do colágeno para formar fibras e feixes, atuando como substância "cimentante" que une as fibrilas entre si (JUNQUEIRA, 1983).

Os mucopolissacarídeos ácidos (M.P.A.) estão presentes no tecido de granulação desde as primeiras horas após a lesão tecidual e aumentam bastante durante a fase de proliferação dos fibroblastos que os produzem. Sua síntese no tecido de granulação tem sido estudada por vários autores, utilizando-se métodos histofotométricos e histoquímicos. Segundo FROMM (1958) e SCHILLING *et alii* (1959) a síntese de mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação é muito rápida durante as primeiras duas ou três semanas. Recentemente, VIZIOLI (1975) confirma que nos processos de granulação provocados por implantação de esponja, a quantidade de mucopolissacarídeos ácidos existentes é bastante grande até o 15º dia após o início do processo, depois do que essa quantidade começa a decrescer. Portanto, a partir do 15º dia os M.P.A. se ligam totalmente às fibras, agregando os feixes de colágeno e produzindo a maturação final do tecido.

Também participam do processo de formação do tecido de granulação várias enzimas importantes, como fosfatase alcalina, que está intimamente associada ao processo de agregação do colágeno; adenosina trifosfatase (AT Pase), que tem sua atividade ligada às necessidades energéticas do tecido, e 5-nucleotidase, que aumenta sua atividade no tecido de granulação durante os primeiros 15 dias de evolução, devido à aceleração da síntese dos ácidos nucleicos, e conseqüentemente aumento do giro dos nucleotídeos.

Passados 15 dias de desenvolvimento, o tecido

de granulação torna-se mais maduro; o número de fibras e de capilares diminui, pois as necessidades de nutrição do tecido começam a decrescer, o que resulta num processo de encolhimento do tecido, provocando uma retração gradual da área. Esse encolhimento tecidual cessa em 5 semanas, e, 45 dias após, o local da ferida é praticamente imperceptível (VIZIOLI & BOZZO, 1976).

Juntamente com essa gama de fatores que intervêm, através de mecanismos diversos, na cronologia de síntese e maturação do colágeno, é necessário falar-se sobre a ação e o efeito de drogas nesse processo.

AALTO M. *et alii* (1972) verificaram os efeitos da serotonina, indometacina e outras drogas antireumáticas na síntese do colágeno e outras proteínas, em tecido de granulação induzido em ratos, por meio de implantação de esponja. A serotonina estimulou a síntese do colágeno; a indometacina e a fenilbutazona inibiram a síntese de proteínas em altas concentrações, estimulando contudo tal síntese, quando em baixas concentrações; a bradicinina histamina e vasopressina também estimularam a síntese de proteínas, incluindo o colágeno.

ANDRADE (1980), estudando a ação de três drogas antiinflamatórias no tecido de granulação induzido artificialmente em ratos, demonstrou que a dexametazona 21- fosfato é potente inibidora da síntese e maturação do colágeno, possuindo a fenilbutazona as mesmas propriedades, embora em grau menor.

Por outro lado, a tripsina interferiu positivamente na síntese e maturação do colágeno, acelerando o processo de reparo.

MAIA (1981), pesquisando também a ação de três drogas: a carnosina, o 2,4 dinitrofenol e o hormônio tiroxina, no tecido de granulação provocado da mesma forma que os anteriormente citados, conclui que a carnosina participa como acelerador do processo de síntese e maturação do colágeno, interferindo positivamente na proliferação do tecido de granulação, tanto qualitativa quanto quantitativamente. O 2,4 dinitrofenol interfere como potente inibidor da síntese de colágeno e o hormônio tiroxina acarreta ligeira redução nesse processo.

JUNQUEIRA (1983), observando o efeito de outras três drogas antiinflamatórias no tecido de granulação, obtido segundo a mesma metodologia dos anteriores, demonstrou que a betametazona é potente inibidora da síntese e maturação do colágeno. A papaína, por sua vez, inibiu de maneira discreta a evolução do tecido de granulação, e o piroxican interferiu positivamente nesse processo, podendo constituir-se portanto, em achado importante dos mecanismos que interferem na reparação tecidual.

Devido à importância da utilização dos antibióticos na medicação pós-operatória da cavidade oral, resolveu-se pesquisar a sua atuação a nível de tecido de granulação.

Em 1942, quando a penicilina G, passou a ser utilizada na prática médica, iniciou-se nova era da história terapêutica medicamentosa. Os anos encarregaram-se de demonstrar a eficácia desse antibiótico e de seus derivados no tratamento de grande variedade de moléstias infecciosas. Logo se aperfeiçoaram os métodos naturais de obtenção dos primeiros antibióticos; isolou-se o núcleo ativo de alguns deles, tornando-se assim possível o preparo de grande número de derivados semi-sintéticos.

Na atualidade, o conceito mais abrangente parece corresponder àquele, segundo o qual se designa por antibiótico toda substância originalmente obtida na natureza, a partir de microrganismos ou extraída de vegetais, capaz de atuar em pequenas concentrações contra agentes infecciosos, mostrando-se ainda útil no tratamento de algumas neoplasias.

Segundo AMATO NETO (1978), os antibióticos são classificados, quanto ao seu mecanismo de ação, em:

1. Antibióticos que interferem na síntese da parede celular: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina.
2. Antibióticos que interferem na função da membrana citoplasmática: anfotiricina B, nistatina, polimixinas.
3. Antibióticos que interferem na síntese de ácidos nucleicos: rifamicinas, griseofulvina.

4. Antibióticos que interferem na síntese proteica:

- a) inibindo a síntese proteica: cloranfenicol, tetraciclina, lincomicina, eritromicina.
- b) determinando a síntese de proteínas anômalas: aminoglicosídeos.

Nesta pesquisa utilizaremos três tipos de antibióticos que apresentam diferentes mecanismos de ação: griseofulvina, tetraciclina, penicilina G bentazina.

GRISEOFULVINA

Produzida pelo *Penicillium griseofulvum*, também pode ser encontrada em culturas do *Penicillium janczewshi*. Foi o primeiro antibiótico, administrado pela via oral, a se mostrar particularmente ativo contra numerosos dermatófitos, produtores de tinas do couro cabeludo e da pele glabra, bem como em onicomioses. Em contrapartida, é ineficaz contra infecções bacterianas e contra uma série de doenças como micetomas, blastomicose, actinomicose. Sua administração pode ser oral ou local. Para adultos a dose é de 0,5 a 1 g/dia, em duas ou quatro parcelas, iniciando-se com quantidade maior, que logo deve ser diminuída. A sua absorção é intestinal e o mais alto teor sanguíneo é alcançado em quatro horas. Sua distribuição é seletiva, aproximadamente 65% da quantidade absorvida encontra-se ligada às proteínas plasmáticas e aos glóbulos

sanguíneos, mas diminutas porções nos líquidos teciduais. A substância é também encontrada nos músculos esqueléticos e em gorduras, mas o principal sítio de sua atuação é a pele. A eliminação se faz grandemente nas fezes, e pequena quantidade se excreta através dos rins. A griseofulvina age bloqueando a síntese de DNA de microrganismos sensíveis, representados por várias espécies de fungos, sendo porém desconhecido o local exato onde ocorre esse bloqueio. Sua relação extrutural com os nucleotídeos purínicos sugere, no entanto, que esse antibiótico possa ser inibidor da síntese de DNA ao nível da participação das purinas.

TETRACICLINAS

Elas foram, a princípio, isoladas de várias espécies de Streptomices. Entretanto, introduziram-se recentemente em terapêutica vários derivados semi-sintéticos, alguns dos quais foram depois encontrados na natureza. O termo genérico tetraciclina é usado para designar todo o grupo. Alguns médicos preconizam que determinadas tetraciclina são superiores a outras clinicamente, mas a maioria é essencialmente semelhante.

As tetraciclina deprimem a síntese proteica e, além do mais, podem romper a membrana da célula bacteriana através da formação de complexos com metais bivalentes essenciais. Parece que elas agem inibindo a união do RNA_t, já ligado ao

amino-ácido, com a subunidade 30 S do ribossoma: as tetraciclina seriam inibidoras da interação codon - anticodon. Como decorrência da inibição da síntese das proteínas, os microrganismos deixam de crescer e tornam-se incapazes de se multiplicar. São antibióticos bacteriostáticos, porém em condições excepcionais podem ser bactericidas. Em geral, as tetraciclina, após administração oral, são absorvidas de forma incompleta e irregular pelo tubo digestivo (estômago e intestino delgado), sendo que cerca de 30% são excretados na forma inalterada. Entretanto, a absorção é em geral adequada para tratar a maioria das infecções. As tetraciclina têm um volume de distribuição um pouco maior do que a água orgânica total, e como elas, são depuradas pelo fígado; grandes concentrações do antibiótico ocorrem no parênquima hepático e na bile, alcançando níveis 10 a 30 vezes maiores que os níveis plasmáticos simultâneos. Elas são excretadas principalmente na urina por filtração glomerular e em menor extensão, na bile e no leite durante a lactação. Existem disponíveis inúmeros preparados para administração oral, parenteral e tópica. A administração oral é a mais indicada sendo que por essa via alcançam concentrações séricas máximas cerca de duas horas depois. Sua prescrição é de 2 g /dia em adultos sendo indicado administração de 6 em 6 horas para que o nível seja mantido na corrente sanguínea.

PENICILINA G BENZATINA

Constitui ainda hoje o principal grupo de antimicrobianos, tanto pela sua eficiência na terapêutica clínica como pelo seu baixo preço de aquisição.

AMATO NETO (1978) classifica a penicilina G benzatina como natural. LAGAZ e col. (1975) classificam-na como semi-sintética. Ela é obtida por processo de fermentação, em geral a partir do *Penicillium chrysogenum*. A benzilpenicilina age sobre a formação da parede celular pela inibição da síntese de mucopéptides. Ela interfere no passo final da síntese da parede celular, inibindo a transpeptidação. Por serem análogas estereoquímicas do segmento molecular onde atua a transpeptidase, as penicilinas desviam para si essa enzima, originando-se complexos desprovidos de atividade. Como decorrência segue-se a formação insuficiente de parede celular, ruptura e dissolução da bactéria. Os antibióticos que atuam assim são bactericidas.

Sua absorção por via oral é precária, sendo facilmente destruída pelo suco gástrico. A introdução de radicais benzatínicos a benzilpenicilina permite liberação protraída, garantindo nível sanguíneo mais prolongado. Assim, a penicilina G benzatina mantém nível sanguíneo de até 25 a 30 dias. Sua concentração máxima no plasma é atingida cerca de oito horas depois de administrada por via intramuscular.

Sua prescrição para adultos é de 1.200.000 unidades de quatro em quatro semanas.

Poucas pesquisas existem elucidando a respeito do efeito dos antibióticos na biossíntese do colágeno. Somente para esclarecimento, citaremos algumas opiniões sobre o assunto.

BOGART *et al* (1981), estudando a distribuição em tecidos e os efeitos da tetraciclina na síntese protéica de mitocôndrias em ratos, após administração intravenosa, verificaram que altas concentrações desse antibiótico tem efeito citotóxico direto, bloqueando inteiramente a síntese protéica. Em baixas concentrações de tetraciclina esta síntese parece também ser prejudicada.

PRIESTLEY & BROWN (1978), estudando os efeitos da griseofulvina no crescimento, metabolismo e morfologia de fibroblastos em cultura de células humanas normais e em fibroblastos de camundongos, verificaram que este antibiótico pode influenciar o número de fibroblastos e, indiretamente, a produção de colágeno e ácido hialurônico, e dessa maneira a griseofulvina pode diminuir diretamente a síntese de ácido mucopolissacarídico, em cerca de 20%, efeito este semelhante ao produzido nas mesmas células pela cortizona (PRIESTLEY, 1978).

A griseofulvina não parece afetar diretamente a síntese colágena, embora a um modesto efeito indireto possa seguir-se uma diminuição da síntese de fibroblastos (PRIESTLEY & BROWN, 1978).

PAGET & WALPOLE (1958) mostraram que, em ratos, altas doses parenterais de griseofulvina causaram em grande escala a interrupção da mitose, durante a metáfase, nos locais de grande "turn-over" celular como a mucosa e o fígado.

CAPÍTULO 2

PROPOSIÇÃO

2 - PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem por objetivo estudar os efeitos de três drogas antibióticas com diferentes mecanismos de ação: uma que interfere na síntese de ácidos nucleicos (griseofulvina), uma que interfere na síntese protéica (tetraciclina) e uma que interfere na síntese da parede celular (penicilina G benzatina), sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Utilizaram-se nesse trabalho 40 ratos (*Rattus norvergicus*, *Albinus*, Wistar), adultos jovens (150 dias), machos, pesando em média 280 g, devidamente alimentados com ração balanceada e água "ad libitum", mantidos em gaiolas, que eram limpas diariamente. Atendida a idade desejada, os ratos foram submetidos ao procedimento de implantação das esponjas.

3.2. MATERIAL USADO

- . campânula de vidro
- . mesa cirúrgica para ratos
- . tesouras de ponta fina e ponta romba
- . pinças diversas
- . placas de Petri
- . porta - agulhas
- . agulhas de sutura
- . seringas centesimais de 1,0 ml
- . agulhas hipodérmicas descartáveis.
- . esponjas de policlorovinil (PVC)

- . fios de algodão, para sutura
- . algodão hidrófilo e gaze esterilizada
- . solução antisséptica (Germ-Hand, Darrow Laboratórios S/A).
- . éter sulfúrico (Indafarma, Ind. e Com. Prod. Químicos).

3.3. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram separados em 4 grupos de 10 animais. De cada grupo utilizaram-se 8 ratos, sendo 2 para reserva. Tornou-se necessário esse cuidado, devido a possibilidade de ocorrer um processo infeccioso ou a morte de algum animal.

Um dos grupos foi denominado do Grupo A (controle), outro de Grupo B (Griseofulvina), outro de Grupo C (tetraciclina) e, finalmente, Grupo D (penicilina G benzatina).

Após a distribuição, os mesmos receberam uma marcação particular para facilitar a identificação ulterior, e foram pesados, para que, a partir dessas pesagens os volumes injetáveis fossem calculados.

3.4. IMPLANTAÇÃO DAS ESPONJAS

Os animais, após distribuição e pesagem, foram sendo anestesiados com éter sulfúrico recebendo, um a um, a implantação das esponjas de policlorovinil do seguinte modo : depilou-se a região dorsal mediana traseira dos animais e praticou-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm em cada lado da coluna vertebral. Com o auxílio de uma tesoura ponta romba procedeu-se a divulsão dos tecidos para possibilitar a introdução da esponja. A mesma foi introduzida com uma pinça tão distante quanto possível do local da incisão, para evitar que a formação do tecido de granulação fosse prejudicada pelo processo de cicatrização da incisão. Após o implante, a incisão foi suturada com um ponto, feito com fio de algodão e agulha, próprios para sutura. Todos esses procedimentos, foram realizados sob condições assépticas.

3.5. ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

Imediatamente após a implantação das esponjas em todos os animais, estes receberam a injeção de uma das seguintes drogas por via intraperitoneal:

GRUPO A: Os animais deste grupo foram injetados com solução salina 0,9%, cada 6 horas, durante três dias. Diante disso foi denominado grupo controle.

GRUPO B: Os animais deste grupo receberam a administração de griseofulvina, na dosagem de 35,7 mg/kg de 12 em 12 horas, durante três dias.

GRUPO C: Os animais deste grupo receberam a administração de tetraciclina, na dosagem de 35,7 mg/kg de 6 em 6 horas, durante três dias.

GRUPO D: Os animais deste grupo receberam a administração de penicilina G benzatina na dosagem de 171.425 u/kg, numa única aplicação.

As drogas utilizadas foram:

- Griseofulvina (Grifulvin MC 500 mg comprimidos - Johnson & Jhonson).
- Tetraciclina (Cloridrato de Tetraciclina 500 mg - cápsulas - Laboratório Zambelletti Ltda).
- Penicilina G Benzatina (Benzetacil - 1.200.000 u - suspensão Laboratório Fontoura Wyith).

É necessário frisar que os intervalos de administração das drogas, foram rigorosamente obedecidos.

3.6. OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO

Após 7 dias, a contar do momento da implantação das esponjas, dois animais de cada grupo foram sacrificados com um golpe occipital e, após isso, foram removidos os tecidos de granulação para estudo. Aos 14, 21, 28 dias foram colhidos o restante do material seguindo-se o mesmo procedimento da coleta aos 7 dias. Escolheu-se o início da avaliação a partir do 7º dia, pois neste tempo, a fase proliferativa da resposta inflamatória está bem estabelecida.

3.7. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA

Um total de 32 ratos, sendo oito por grupo e dois para cada dia de sacrifício, forneceu o material para os estudos comparativos da morfologia e evolução quantitativa do tecido de granulação.

Os tecidos de granulação, retirados dos animais, foram fixados em formol cálcio a 10%, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram incluídos segundo a técnica de rotina, e corados com hematoxilina-eosina, sendo, posteriormente, levados ao microscópio óptico para observação dos resultados.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

A implantação subcutânea da esponja de PVC provocou uma reação inflamatória, como resposta à agressão do corpo estranho. Ocorreu a formação de uma cápsula fibrosa que envolveu por completo a esponja. É a partir dessa cápsula fibrosa que os elementos celulares migraram para o interior da esponja, através de seus poros e começaram a proliferar.

A sequência observada da proliferação do tecido de granulação, nos seus respectivos dias e grupos, foi a seguinte:

7 DIAS

Podemos observar nas figuras 1 e 2 (fotos A) que correspondem ao grupo controle, a cápsula fibrosa perfeitamente delineada, circunscrevendo todos os limites da esponja de PVC. A partir dessa cápsula observamos a presença de grande número de células fibrogênicas, oriundas de células totipotentes ou mesenquimais, tomando grande parte da área. Constatamos, também, a presença de grande número de capilares neoformados. As fibras colágenas, nesse estágio, ainda são em número bastante reduzido. Comparando-se o grupo controle com os demais tecidos em análise, ou seja, os que receberam tratamento com agentes antibióticos, podemos notar o seguinte:

O tecido de granulação obtido dos animais tratados com griseofulvina, mostrado nas figuras 1 e 2 (fotos B), demonstrou um crescimento menor, caracterizado por uma menor proliferação fibroblástica e quase nenhuma presença de fibras colágenas, bem como discretos capilares neoformados. Portanto, esse tecido apresentou-se com desenvolvimento levemente retardado em relação ao grupo controle.

Já, os animais tratados com tetraciclina apresentaram o tecido de granulação praticamente idêntico ao grupo controle, ou seja, com um crescimento proliferativo análogo. O aspecto geral do tecido de granulação de sete dias, de animais com tetraciclina pode ser observado nas figuras 1 e 2 (fotos C).

O tecido de granulação obtido dos animais que receberam a administração intraperitoneal de penicilina G benzatina, também evoluiu de maneira semelhante ao controle. Quantitativamente, apresentou número de células um pouco menor, inclusive fibroblastos. Observaram-se ainda alterações circulatórias bastante pronunciadas. Figuras 1 e 2 (Fotos D).

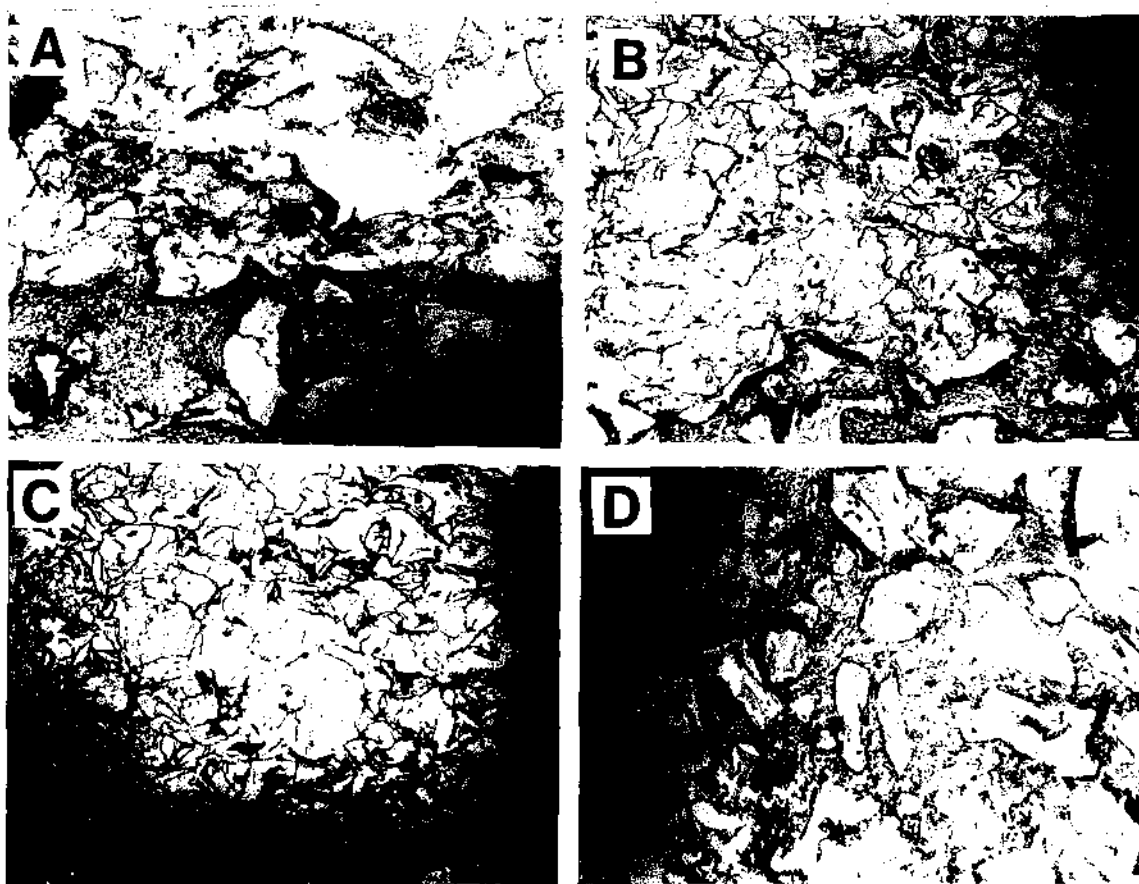


Figura 1. Tecido de granulação dos diferentes grupos, aos 7 dias de desenvolvimento. Aumento original 12,5 x.

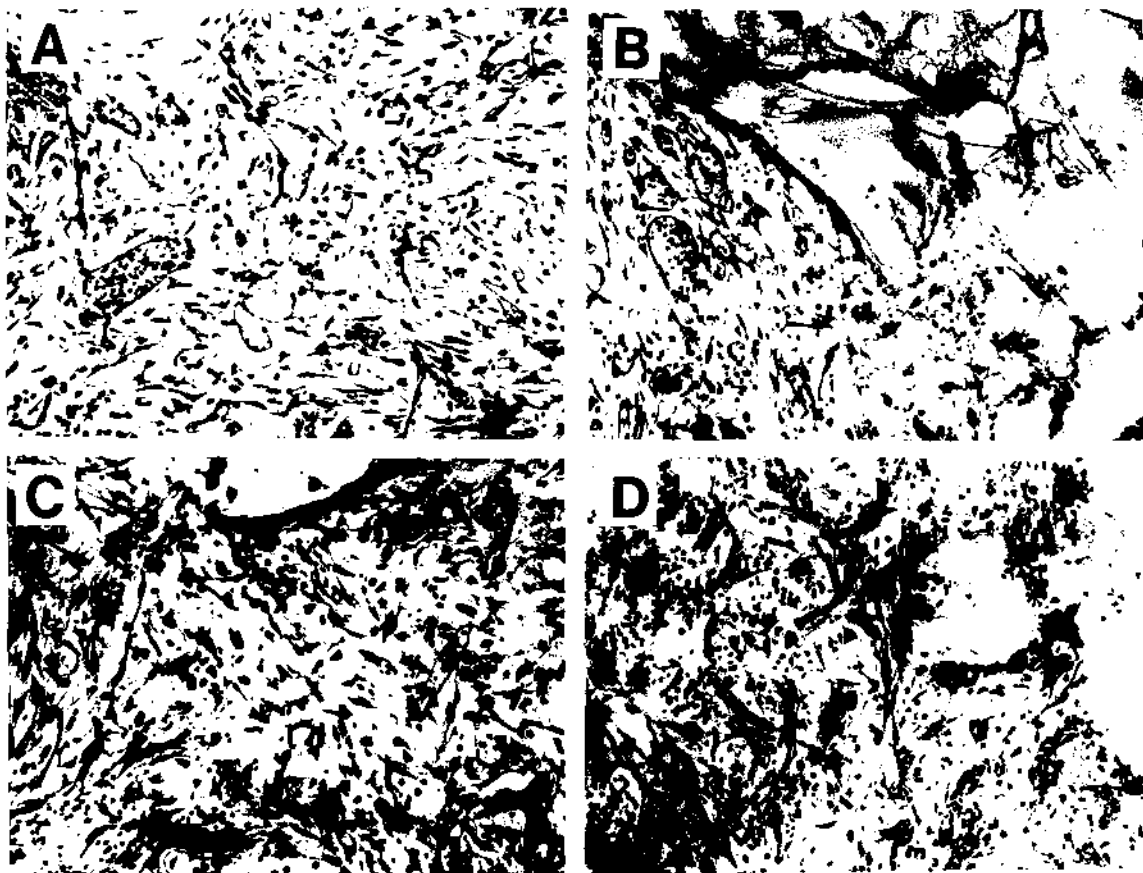


Figura 2. Tecido de granulação dos quatro grupos, aos 7 dias. Nota-se que o tecido correspondente a foto B apresenta-se com um desenvolvimento retardado em relação ao grupo controle. Enquanto que os tecidos dos grupos C e D apresentam-se com crescimento proliferativo análogo ao grupo A (controle). Aumento original 80 X.

14 DIAS

Observou-se aos 14 dias pós-implante que o tecido de granulação do grupamento controle (figuras 3 e 4 , fotos A) , evoluiu satisfatoriamente, com aparecimento de fibras colágenas, ocupando quase todos os espaços da esponja, que, a essa altura, começou a ser comprimida pelo tecido em crescimento. No grupo B persiste um atraso pequeno caracterizado por um menor número de fibras colágenas e demonstrando um aspecto menos ordenado que o grupo controle. Com relação ao grupo C , animais que receberam tetraciclina, observa-se que o aspecto do tecido mostrou-se praticamente idêntico ao grupo controle. O grupo D, animais que receberam penicilina G benzatina, apresentou, também, um desenvolvimento análogo ao grupo A , porém menos fibrosado e, continuou a apresentar alterações circulatórias, porém não tão pronunciadas como aos 7 dias.

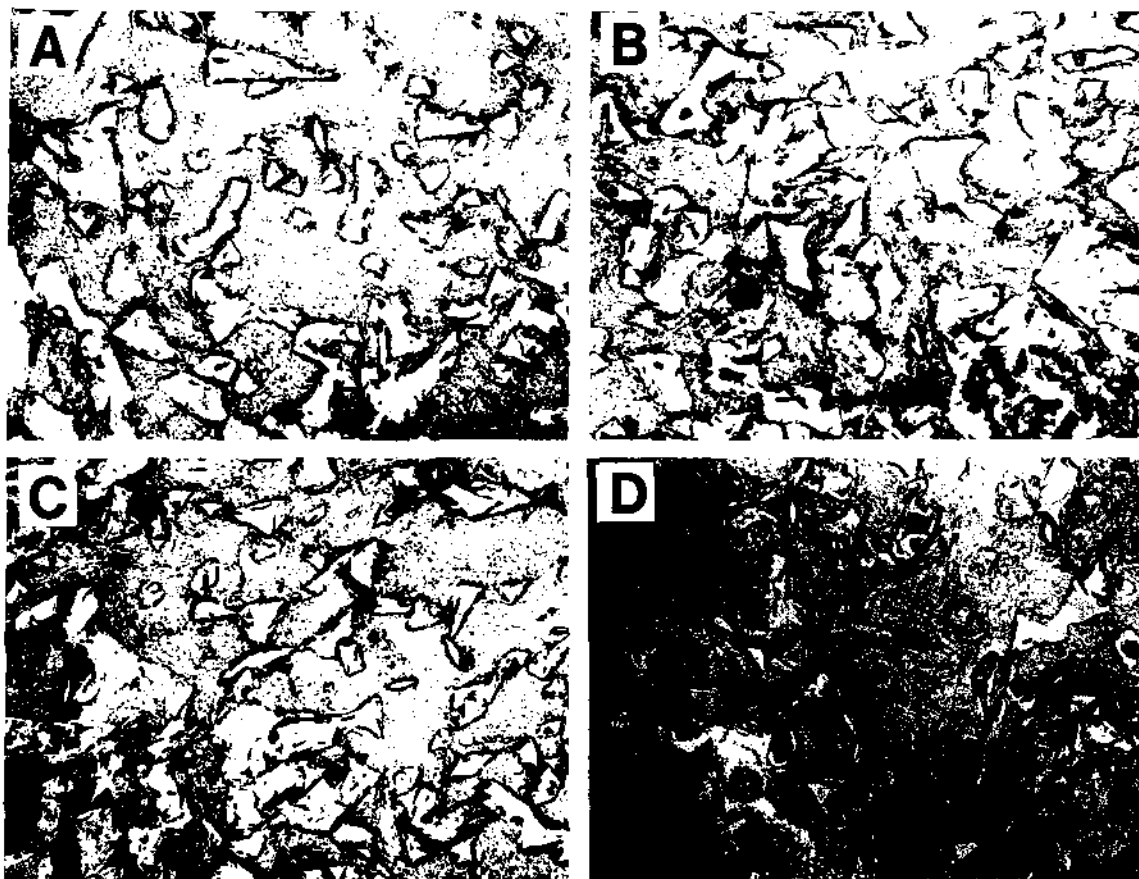


Figura 3. Tecidos de granulação dos grupos A , B , C e D aos 14 dias de evolução. Os tecidos dos animais tratados com solução salina tetraciclina e penicilina, respectivamente grupos A , C e D continuam se desenvolvendo normalmente, apresentando maior quantidade de fibras colágenas e maior fibrosamento em relação aos 7 dias. Enquanto que o tecido da foto B, continua com um atraso pequeno em relação ao grupo controle. Aumento original 12,5 X .

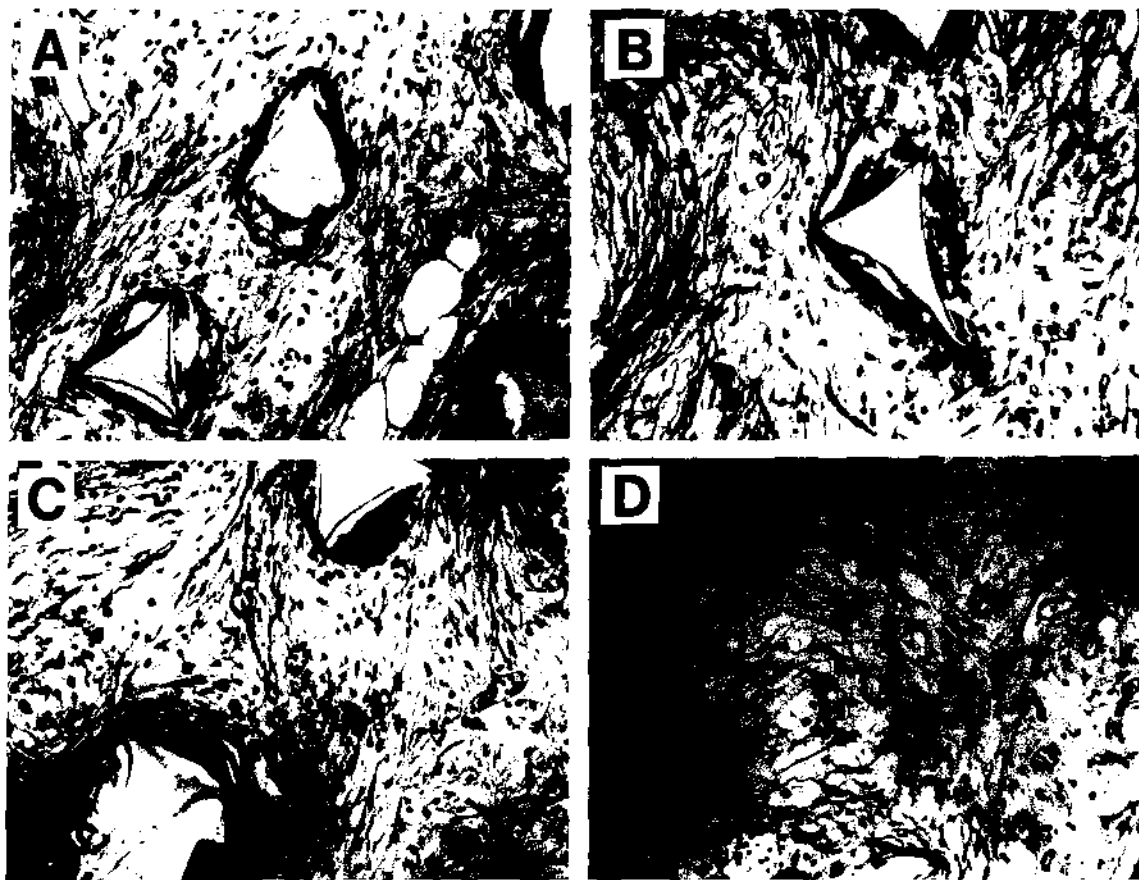


Figura 4. Tecido de granulação aos 14 dias de evolução, confirmando as observações anteriores. Aumento original 80 X .

21 DIAS

Neste estágio de desenvolvimento, após 3 semanas de evolução, os tecidos dos quatro grupos não apresentam diferenças significativas entre si. O desenvolvimento do tecido de granulação é satisfatório. Nota-se que a quantidade de fibroblastos e fibras colágenas continua aumentando. As figuras 5 e 6 mostram, em diferentes aumentos, uma vista geral dos tecidos de cada grupo.

O tecido do grupo D, tratado com penicilina G benzatina, apresentou um fibrosamento discretamente menor em relação aos demais e alterações circulatórias em menor intensidade.

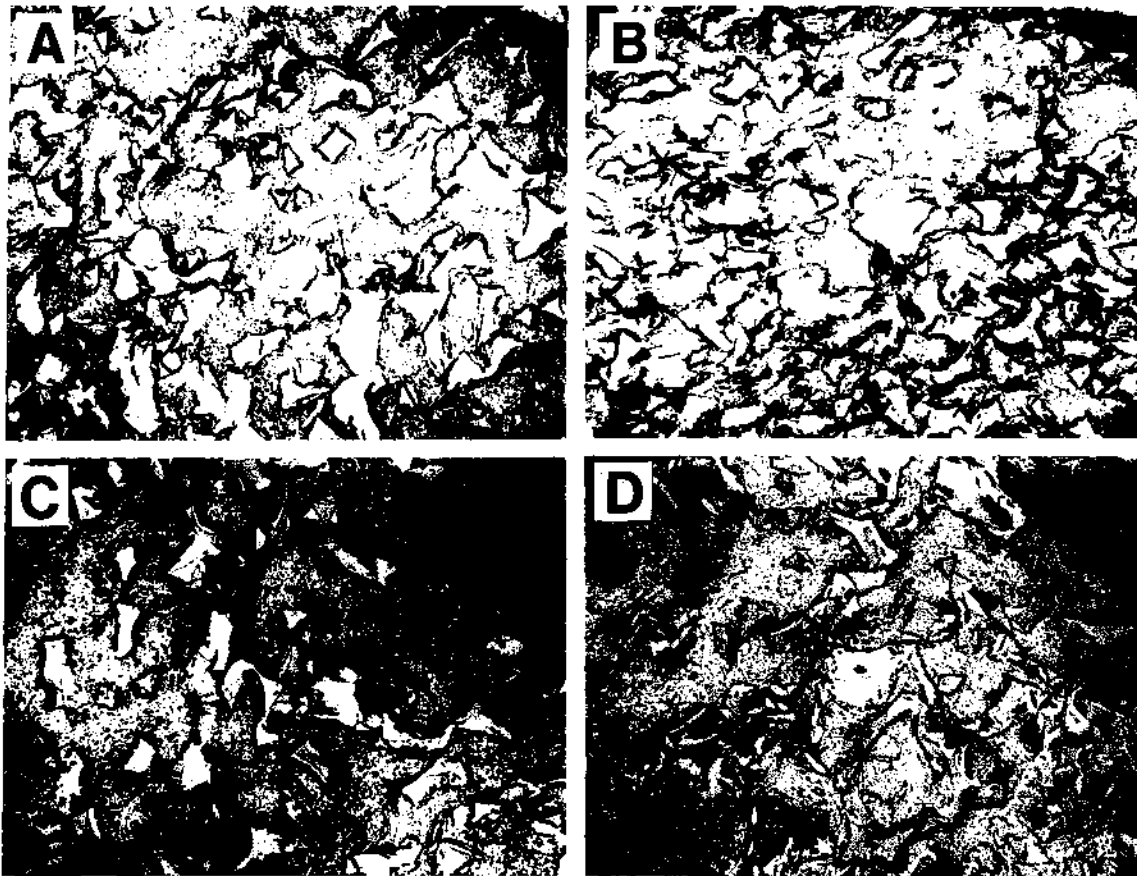


Figura 5. Tecidos de granulação após 3 semanas de evolução (21 dias). Os tecidos dos quatro grupos não apresentam diferenças significativas. Nota-se que a quantidade de fibroblastos e fibras colágenas continua aumentando. Aumento original 12,5 X.

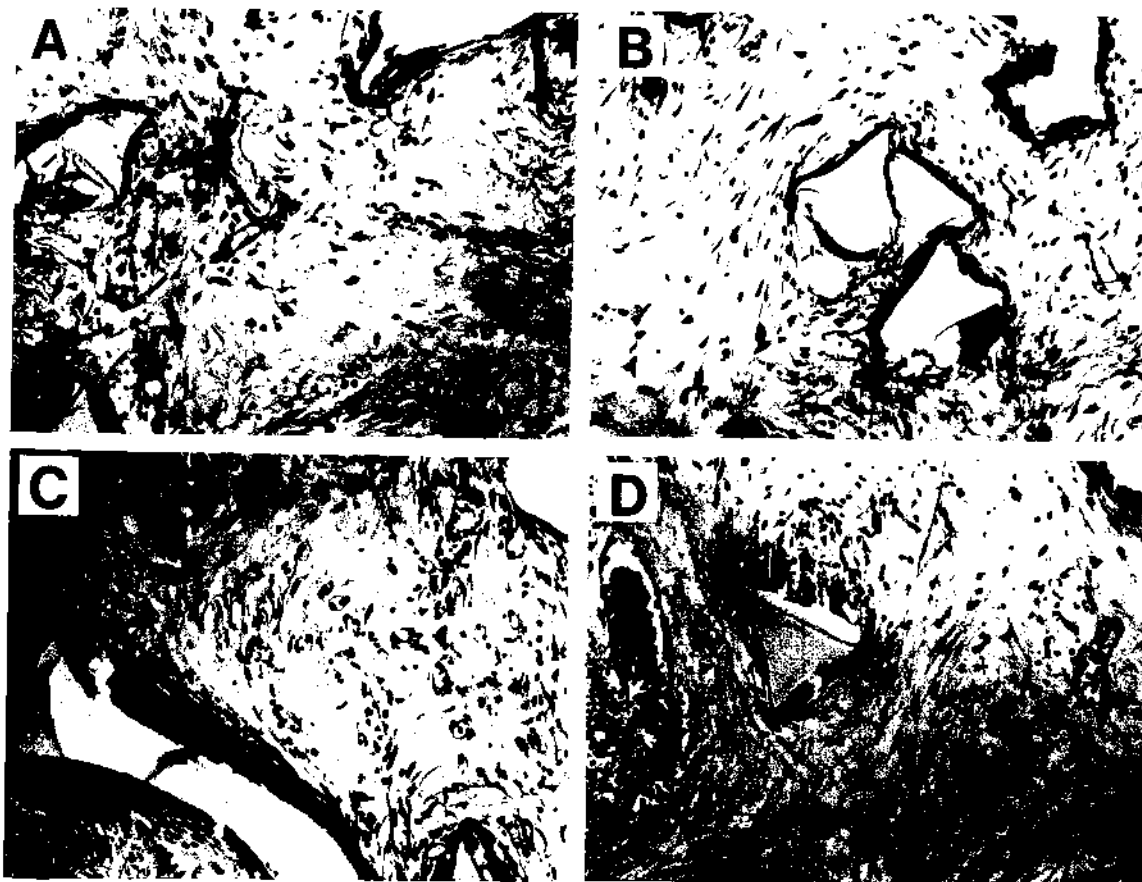


Figura 6. Mesmo tempo de estudo (21 dias), confirmando as observações da figura 5. Aumento original 80 X .

28 DIAS

Os tecidos de granulação dos quatro grupos em observação apresentam-se completamente maduros, e mostram feixes de fibras colágenas tomando os espaços da esponja. Observa-se uma acentuada redução da celularidade, bem como da neoformação de capilares sanguíneos. Os fibroblastos, nesse estágio, são ligeiramente alongados, havendo desaparecimento quase que completo das células inflamatórias. Os tecidos de granulação correspondentes a todos os grupos de 28 dias podem ser observados nas figuras 7 e 8 .

Nota-se que o grupo D , ainda, apresenta algumas alterações circulatórias.

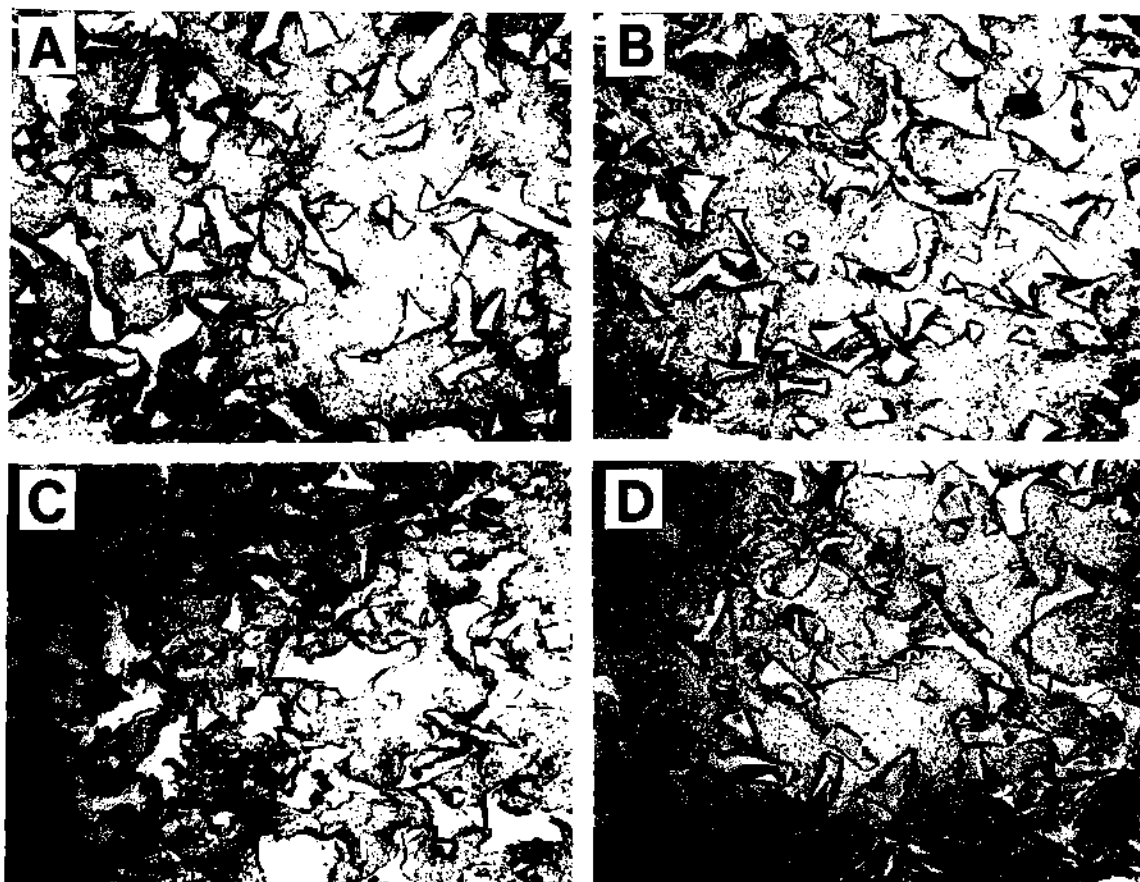


Figura 7. Vinte e oito (28) dias de desenvolvimento dos tecidos. Os quatro grupos mostram-se bastante evoluídos. Aumento original 12,5 X .

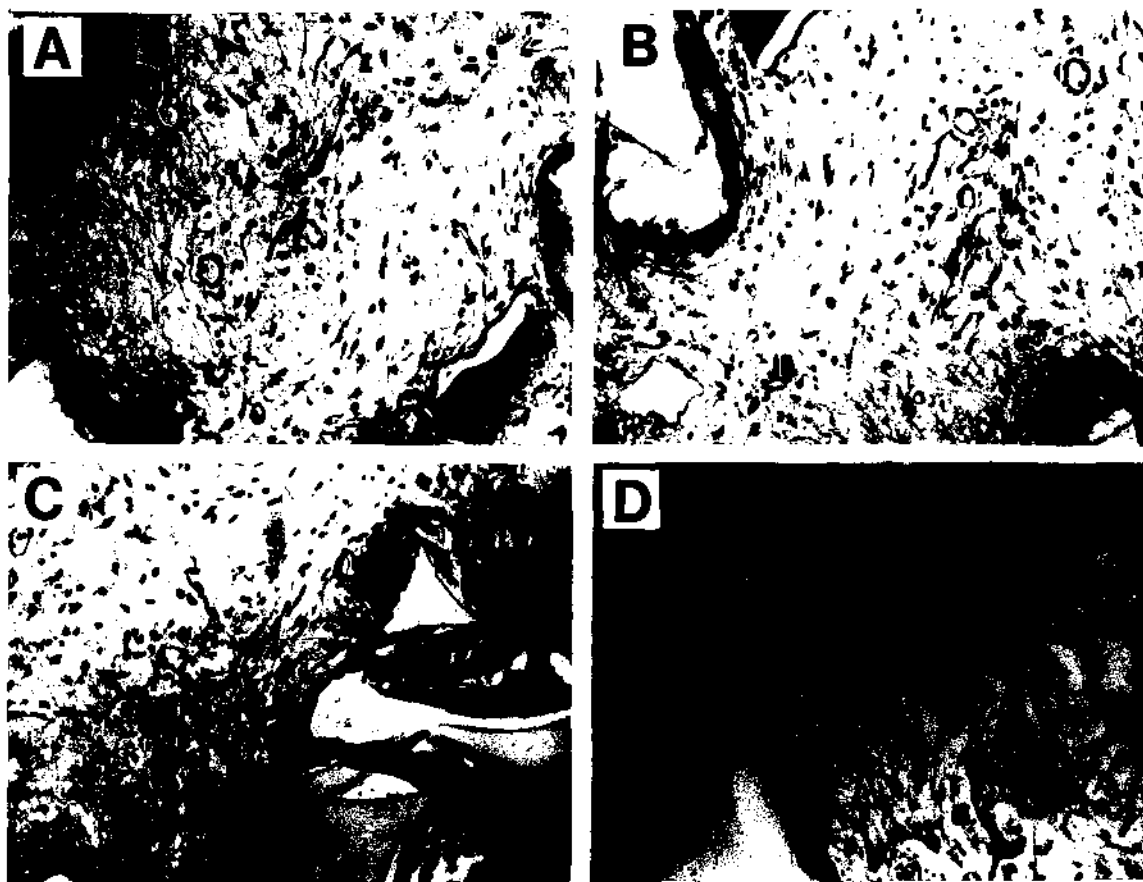


Figura 8. Tecido de granulação aos 28 dias de evolução. Observa-se que os tecidos dos quatro grupos apresentam-se maduros, caracterizados pela diminuição da celularidade e da neoformação de capilares sanguíneos. Aumento original 80 X.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Através da implantação subcutânea da esponja de PVC, conseguiu-se provocar a formação do tecido de granulação. O início dessa formação se deu na primeira semana após a implantação, por meio da migração de células fibrogenéticas e totipotentes advindas da cápsula fibrosa envolta na esponja implantada experimentalmente.

Esses elementos celulares proliferaram até por volta do 21º dia de desenvolvimento do tecido, como verificamos em nosso experimento, quando então a fase proliferativa propriamente dita termina e estabelece-se a organização e maturação do tecido. Isso confirma, de maneira geral, os achados de GRINDLAY & WAIGH (1951); DUNPHY & UDUPA (1955); CHVAPIL (1967); HICKS (1969); FEHER *et al* (1971); VIZIOLI (1971, 1973); PEDERSEN & VIIDIK (1972); FUKUHARA (1972); VIZIOLI & ALMEIDA (1978); ANDRADE (1980); MAIA (1981); JUNQUEIRA (1983).

Os parâmetros utilizados para as avaliações microscópicas prendem-se à quantidade de células fibrogenéticas e mesenquimais e à neo-formação de capilares sanguíneos encontrados nos tecidos. Com a evolução da resposta proliferativa, tornam-se fatores importantes o teor do colágeno presente, a sua agregação sob a forma de feixes, e o direcionamento organizado dos mesmos. Esses parâmetros foram já utilizados em pesquisas anteriores, da mesma natureza, por VIZIOLI & ALMEIDA.

(1978), ANDRADE (1980), MAIA (1981), JUNQUEIRA (1983).

De uma maneira geral, de acordo com o descrito anteriormente, o comportamento das fases de formação do tecido de granulação não diferiu muito entre o grupo controle e os outros três grupos que receberam medicação antibiótica.

Em relação ao grupo controle, os tecidos dos ratos que receberam a administração de griseofulvina apresentaram aos 7 dias de evolução um crescimento menor, caracterizado por uma proliferação fibroblástica diminuída e quase nenhuma presença de fibras colágenas, bem como discretos capilares neoformados. Essas constatações nos fazem indagar a razão pela qual isto se dá.

PAGET & WALPOLE (1958) mostraram em ratos, que altas doses parenterais de griseofulvina causavam em grande escala a interrupção da mitose, na metáfase, em lugares como o fígado e mucosa onde ocorre grande "turn-over" celular.

Segundo PRIESTLEY & BROWN (1978) a griseofulvina pode influenciar o número de fibroblastos e consecutivamente, de forma indireta, a síntese de seus produtos específicos, como colágeno e ácido hialurônico. Em adição a esse efeito o medicamento pode diminuir a síntese de ácido mucopolissacarídico. O grau de diminuição é de cerca de 20% , sendo equivalente ao produzido nas mesmas células pela hidrocortizona, um medicamento antiinflamatório bastante potente (PRIESTLEY, 1978).

Provavelmente essa diminuição do número de fibroblastos tanto em cultura de células de fibroblastos humanos como em linhas estabelecidas 3T₃ e 3T₆ de fibroblastos de camundongos, se dê pela supressão mitótica observada durante a anáfase e a telófase e, ainda, pelo baixo índice mitótico de fibroblastos humanos (PRIESTLEY & BROWN, 1978).

Tais resultados, obtidos por estes pesquisadores, "in vitro" podem não ocorrer "in vivo", e mesmo que eles ocorram, a concentração do medicamento nas duas situações é uma questão de suposição.

Os efeitos inibidores descritos aqui não devem causar alarme no uso clínico da griseofulvina e, na verdade, podem ajudar a explicar os resultados benéficos nas doenças de tecido conjuntivo onde o metabolismo de fibroblastos e a produção de macromoléculas é excessivamente anormal.(PRIESTLEY & BROWN, 1978).

O antibiótico griseofulvina mostrou notável baixa toxicidade nos seus 20 anos de uso dermatológico contra infecções fúngicas; entretanto, vários efeitos colaterais de benefício potencial incluindo vaso-dilatação e atividade anti-inflamatória têm sido relatados levando seu uso experimental para condições não fúngicas, como a síndrome de Raynaud (ALLEN, 1971) , escleroderma (GIORDANO, 1967) , artrite reumatóide e síndrome de ombro e mão (COHEN *et al*, 1960 ; SERRE & SIMON,

1962). O modo de ação da droga nesses casos é desconhecido, embora algumas semelhanças de estrutura e atividade com a colchicina têm levado a especulação que a inibição colágena de ve ser importante.

Diante do exposto, sugerimos que a discreta diminuição da síntese colágena observada em nosso experimento aos 7 dias de evolução do tecido de granulação possa ser atribuída à diminuição da síntese de fibroblastos ocasionada, por sua vez, pela diminuição do índice mitótico dos mesmos.

Já, os estudos microscópicos dos tecidos dos ratos tratados com os antibióticos tetraciclina e penicilina G benzatina revelaram no primeiro estágio de observação, ou seja, ao fim da primeira semana de evolução, um aspecto semelhante ao do tecido do grupo controle e neles evidencia-se a cápsula fibrosa perfeitamente delineada, circunscrevendo todos os limites da esponja de PVC. A partir dessa cápsula observamos a presença de grande número de células fibrogênicas, tomando grande parte da área. Constatou-se, também, a presença de grande número de capilares neo-formados. As fibras colágenas, nesse estágio, ainda são em número bastante reduzido.

Aos 14, 21 e 28 dias observou-se que o desenvolvimento dos tecidos de granulação continuou se mostrando praticamente idêntico ao grupo controle.

Notamos, somente nos tecidos tratados com penicilina G benzatina, o aparecimento de alterações circulatórias bastante pronunciadas, presentes em todas as fases de observação. Não encontramos na bibliografia consultada nada que esclarecesse esse fato.

Ficou claro, em nosso experimento, que o aspecto do desenvolvimento tissular assemelhou-se muito àquele observado no tecido dos ratos controle, em todas as fases observadas, mostrando portanto que, desse ponto de vista, os antibióticos tetraciclina e penicilina G benzatina não exercem nenhuma ação específica, ou, se exercem esta ação, não é evidenciada pela microscopia comum e por métodos histológicos de rotina.

FISHMAN & HEWITT (1970) descobriram que a penetração antibiótica em áreas avasculares, abscessos ou matrizes de fibrina pode ser reduzida. Surge portanto a questão: a lesão granulosa humana é uma área avascular? Os excelentes experimentos realizados por ORDER *et al* (1965) demonstraram que, embora a escara de uma queimadura grave seja avascular, uma vez removida as granulações aparecem e a neovasculatura se encontra presente. Todavia, parece que, embora a vasculatura pareça abundante no tecido de granulação, ele é, qualitativa e quantitativamente diferente de outros ferimentos. Segundo sugestão de ROBSOM *et al* (1974), a base de fibrina de um ferimento

mento granular parece evitar que o sangue portador da maioria dos antibióticos penetre no tecido de granulação.

Portanto, com base nos trabalhos anteriormente citados e no experimento por nós realizado, sugerimos que os antibióticos tetraciclina e penicilina provavelmente, não interferiram no processo de síntese e maturação colágena em tecido de granulação pois, esses antibióticos não conseguiram penetrar de forma satisfatória no mesmo.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nessa pesquisa, levando-se em consideração as condições utilizadas no presente trabalho, conclui-se que :

- 6.1 - A griseofulvina na dose de 35,7 mg /kg , injetada intraperitonealmente em ratos a cada 12 horas, durante três dias, inibiu de maneira discreta a síntese e maturação do colágeno.
- 6.2 - A tetraciclina na dose de 35,7 mg /kg , injetada intraperitonealmente em ratos a cada 6 horas, durante três dias, não interferiu no processo de evolução do tecido de granulação.
- 6.3 - A penicilina G benzatina quando administrada em dose única de 171.425 u/kg não demonstrou interferência no processo de evolução do mesmo tecido.

CAPÍTULO 7

RESUMO

7 - RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos de três drogas antibióticas de diferentes mecanismos de ação: uma que interfere na síntese de ácidos nucleicos (griseofulvina), outra que interfere na síntese da proteína (tetraciclina) e outra que interfere na síntese da parede celular bacteriana (penicilina G benzatina), no desenvolvimento do tecido de granulação induzido em ratos, por meio da implantação de esponja.

Os resultados obtidos demonstraram que a griseofulvina na dose de 35,7 mg /kg inibiu de maneira discreta a proliferação fibroblástica e a síntese colágena. Já a tetraciclina na dose de 35,7 mg /kg e a penicilina G benzatina na dose de 171.425 u/kg não interferiram na proliferação do tecido de granulação.

De posse desses resultados pode-se concluir que o antibiótico griseofulvina, na dose utilizada, constitui-se num recurso terapêutico quando houver necessidade de uma inibição discreta na proliferação fibroblástica e na síntese colágena. Já os antibióticos tetraciclina e penicilina G benzatina não tendo apresentado, aparentemente, ação sobre o tecido de granulação não seriam, portanto, indicados em terapias de aceleração ou inibição da síntese e maturação deste mesmo tecido.

CAPÍTULO 8

SUMMARY

8 - SUMMARY

This paper reports a study on the effects of three antibiotics with different mechanisms of action : Griseofulvin, which interferes with the nucleic-acids synthesis; Tetracyclin, which interferes with the proteic synthesis and Benzathine penicillin G , which interferes with the bacterial cell wall synthesis in the granulation tissue development induced in rodents by sponge implantation.

The results obtained have demonstrated that Griseofulvin at a dosage of 35,7 slightly inhibited the fibroblastic proliferation and the collagen synthesis. On the other hand, Tetracyclin at a dosage of 35,7 mg /kg and Benzathine penicillin G at a dosage of 171.425 u /K did not interfere with the granulation tissue proliferation.

These results suggest that the antibiotic Griseofulvin at the dose used appears to be the therapeutic resource whenever the necessity of a slight inhibition either of fibroblastic proliferation or of the collagen synthesis.

Having not apparently acted upon the granulation tissue the drugs Tetracyclin and Benzathine penicillin G would not therefore be indicated for synthesis acceleration or inhibition therapy and maturation of the same tissue.

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) AALTO, M. & KULOMEN, E. Effects of serotonin, indomethacin and other antirheumatic drugs on the synthesis of collagen and other proteins in granulation tissue slices. Biochem. Pharmac., 21:2835-40, 1972.
- 2) ALLEN, B.R. Grisofulvin in Raynaud's phenomenon. Lancet, i.i.:840, 1971.
- 3) AMATO NETO, V. *et alii*. Antibióticos na prática médica. 2a. ed. São Paulo, Gremed, 1978. p. 13, 14, 28, 101, 104, 105, 108.
- 4) ANDRADE, E.D. Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias. Piracicaba, 1980.
[Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba].
- 5) BAZIN, S.; LE LOUS, M.; DELAUNAY, A. Collagen in granulation tissues. Agents Actions, 6:272-6, 1976.
- 6) ———; PELLIETIER, M.; ———. The influence of chemical mediators of acute inflammation on the cells of a subacute inflammation. Agents Actions, 3:317-21, 1973.

- 7) BEVAN, J.A. *et alii*. Fundamentos de Farmacologia. São Paulo, Harper e Row do Brasil, 1979. p. 407, 408.
- 8) BOGERT, C. & KROON, A.M. Tissue distribution and effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats. Biochem. Pharmac., 30(12):1706-9, 1981.
- 9) BIBLILOLO, L. Patologia. 2a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p. 87, 111.
- 10) COHEN, A.; GOLDMAN, J.; DANIELS, R. & KANENSON, W. Treatment of shoulder-hand syndrome with griseofulvin. Journal of the American Medical Association, 173:542, 1960.
- 11) ———; LEWIS, L.A.; RESNIK, S.S. Wound healing: a brief review. Int. J. Derm., 14:722-6, 1975.
- 12) CHVAPIL, M. Physiology of connective tissue. London, Butterworths, 1967. p. 358-86.
- 13) DALAUNAY, A. & BAZIN, S. Reparation du tissue conjonctif. Archs Ophtal., 35:115-26, 1975.

- 14) DUNPHY, J.E. & UDUPA, K.N. Chemical and histochemical sequences in the normal healing of wounds. New Engl. J. Med., 253:847-52, 1955.
- 15) ENGLER, R. & JAYLE, M.F. Glycoprotéines plasmatiques et processus granulomateux. Annls Anat. path., 21:45-58, 1976.
- 16) FEHER, J.; JENNINGS, E.H.; RANNIE, I. Histological study of fibrogenesis in experimental inflammation with special reference to elastic tissue formation. Br. J. exp. Path., 52:621-6, 1971.
- 17) FISHMAN, L.S. & HEWITT, W.L. The natural peniciline. Med. Cin. N. Amer., 54:1081, 1970.
- 18) FROMM, H.S. Distribution of sulfur in regenerating wound tissue. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97:246-9, 1958.
- 19) FUKUHARA, M. Modifications of collagen and non fibrillar proteins and cathepsin activity in the canageenin-granuloma. Path. Biol., 20:887-93, 1972.
- 20) GIORDANO, M. Griseofulvin for scleroderma. Lancet, ii : 260, 1967.

- 21) GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. Plastic sponge with acts as a framework for living tissue. Archs Surg., 63:288-93, 1951.
- 22) GUYTON, A.C. Tratado de Fisiologia Médica. 5a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1971. p. 25-46.
- 23) HICKS, R. The envalvation of inflammation induced by material implanted subcutaneously in the rat. J.Pharm. Pharmac., 21:581-8, 1969.
- 24) IM, M.J.C.; FRESHWATER, M.F.; HOOPES, J.E. Enzyme activities in granulation tissue: energy for collagen synthesis. J. surg. Res., 20:121-5, 1976.
- 25) JUNQUEIRA, M.E.R. Estudo histológico dos efeitos de drogas antiinflamatórias (betametazona, papaína e piroxican) sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos. Piracicaba, 1983. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba].
- 26) JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 2a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1971. p. 25-46.
- 27) LACAZ, C.S. Antibióticos. 3a. ed. São Paulo, Edgard Blucher, 1975. p. 109, 153, 154.

- 28) LOWTHER, D.A.; GREEN, N.M.; CHAPMAN, J.A. Morphological and chemical studies of collagen formation. II. Metabolic activity of collagen associated with subcellular fractions of guinea pig granuloma. J. biophys. biochem. Cytol., 10:373-80, 1961.
- 29) MADDEN, J.W. & PEACOCK JR., E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. Surgery, 64:288-94, 1968.
- 30) MAIA, A.S. Efeitos do 2,4 dinitrofenol, carnosina e tiroxina sobre o desenvolvimento do tecido de granulação. Piracicaba, 1981. 76 p. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba].
- 31) Mc MINN, R.M.H. & PRITCHARD, J.J. Tissue repair. London Academic Press, 1969. p. 14-40.
- 32) ORDER, S.E.; MASON, A.D.; WALKER, H.L.; LINDERBERG, R.B.; SWITZER, W.E.; MONCRIEF, J.A. Vascular distributive effects of Thermal injury and its relationship to burn wound sepsis. J. Trauma, 5:62, 1965.
- 33) PAGET, G.E. & WALPOLE, A.L. Some cytological effects of griseofulvin. Nature, 182:1320, 1958.

- 34) PEDRESEN, P. & VIIDIK, A. Maturation of collagen in healing wounds in young and old rats. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 6:16-23, 1972.
- 35) PRIESTLEY, G.C. Effects of corticosteroids in human volunteers. Br. J. Derm., 99:988, 1978.
- 36) ————— & BROWN, J.C. Effects of griseofulgin on the morphology, growth and metabolism of fibroblasts in culture. Br. J. Derm., 99(3):245-52, 1978.
- 37) PROCKOP, J.; PETERKOFKY, B.; UNDERFRIEND, S. Studies on the intracellular localization of collagen synthesis in the intact chick embryo. J. biol. Chem., 237:1581-6, 1962.
- 38) ROBSON, M.C. *et alii*. The efficacy of sustemics antibiotics in the treatment of granulating wounds. J. surg. Res., 16:299-306, 1974.
- 39) ROSS, R. The fibroblast and wound repair. Biol. Rev., 43: 51-96, 1968.
- 40) SCHILLING, J.A. Wound healing. Surg. Clins N. Am., 56: 859-73, 1976.

- 41) SERRE, H. & SIMON, L. Unexpected therapeutic action of an antibiotic fungicid (griseofulvin) in rheumatology. Presse Medicale, 70:2263, 1962.
- 42) VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge induced granulation tissue as revealed by dichroism. Acta anat., 80:73-81, 1971.
- 43) ————. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. Acta anat., 85:358-77, 1973.
- 44) ————. Relação entre fosfomonoesterases e a síntese de de colágeno e mucopolissacarídeos ácidos no tecido de granulação. Piracicaba, 1975. [Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba].
- 45) ———— & ALMEIDA, O.P. Effects of carnosine on the development of rate sponge-induced granulation. I. general morphology and glycosaminoglycans histofotometry. Cell. molec. Biol., 23:267-73, 1978.
- 46) ———— & BOZZO, L. Patologia geral. Piracicaba, Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, 1976. 235 p. (Apostila).

- 47) VIZIOLI, M.R.; BLUMEN, G.; EL-GUINDY, M.M. Granulation tissue: Histofotometric and radioautografic observations on glycosaminoglycans and collagen synthesis and their relation with alkaline phosphatase. Anals Histochem., 21:237-45, 1976.
- 48) —————; BOZZO, L.; VALDRIGHI, L. Alkaline phosphatase activity and the development of rate sponge-induce granulation tissue. Acta anat., 83:60-9, 1972.