

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Reparo de lesões cutâneas em *Ratus norvegicus* após
administração de humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus
maculatus* lacepede, 1803 Pimeloidae).**

Clarissa Xavier Resende Valim

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia
para a Obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Reparo de lesões cutâneas em *Ratus norvegicus* após
administração de humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus
maculatus* lacepede, 1803 Pimeloidae).**

Clarissa Xavier Resende Valim

Dra. Paula Dechichi

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia para a
Obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Reparo de lesões cutâneas em *Ratus norvergicus* após
administração de humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus
maculatus* lacepede, 1803 Pimeloidae).**

Clarissa Xavier Resende Valim

Aprovado pela Banca Examinadora em 18/09/2006 Nota: 100



Profa. Dra. Paula Dechichi
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 18 de setembro de 2006

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família que sempre me incentivou, apoiou e, sobretudo acreditou em mim e no meu trabalho durante todos esses anos. À minha mãe Eleonor, acima de tudo, por ser meu exemplo, meu guia, por ser essa pessoa extraordinária que sempre admirei e na qual me espelhei. Aos meus irmãos Rodrigo e Isabella que sempre estiveram do meu lado. Aos meus avós Elza e Afra por serem minhas segundas mães, e Modesto e Ivan por serem meus segundos pais, admiro muito vocês.

À Prof. Dra. Eloisa por ser a pessoa que abriu as portas da Histologia para mim, quem acreditou no meu potencial e me apresentou para a Paula, minha tão querida orientadora.

À Jucélia, que sempre esteve disposta a me ajudar na parte burocrática na minha busca pelos Mandis.

Ao Hégio, o mestre do computador da Histologia, e ao Rui, o mestre da microscopia ótica que sempre me ajudaram no que eu precisasse.

Ao técnico da Histologia Thiago, o qual sempre me ajudou no processamento histológico.

Ao Jorge e ao Pé, os melhores pescadores da região de Uberlândia, que se disponibilizaram a passar dias me ajudando em busca dos meus peixes.

Aos técnicos da Fisiologia, sobretudo ao Helinho e ao Sr. Antônio que me ajudaram na parte experimental com os ratinhos.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e pelo convívio diário.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira, o qual me recebeu em seu laboratório de biofísica e me abriu espaço para que eu desenvolvesse parte do trabalho, sempre com muita paciência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belletti por sua colaboração e pelas discussões que enriqueceram o meu trabalho.

A Andreia, minha amiga e companheira que me ajudou durante todo o desenvolvimento do trabalho sempre com tanta paciência e dedicação.

A Prof. Dra. Paula Dechichi, por sua orientação, dedicação e paciência, e por ter me ensinado tanto não somente em termos científicos, mas, como exemplo de vida.

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo durante todos esses anos de faculdade, fizeram parte das minhas alegrias e frustrações e me apoiaram em tudo. Obrigada, vocês foram minha segunda família.

Resumo

O conhecimento popular aconselha, quando ocorre ferimento pelo esporão do Mandi-amarelo, a fricção no local com o olho do peixe a fim de aliviar a dor e favorecer a cicatrização. O objetivo desse estudo foi realizar avaliação macroscópica e microscópica do processo de reparo de lesões cutâneas em *Ratus norvegicus*, após a utilização do humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*). Foram utilizados 60 ratos divididos em dois grupos, controle e experimental. No dorso dos animais foram produzidas lesões com 1cm de diâmetro. Após a cirurgia e a cada 24 horas foi aplicado 75µl de solução de humor vítreo de Mandi-amarelo em PBS no grupo experimental e apenas PBS no grupo controle. As lesões foram medidas, diariamente, com paquímetro para cálculo da área e o aspecto macroscópico da lesão foi avaliado. Ao final de 2, 5 e 7 dias, dez animais de cada período foram sacrificados, a região da lesão foi removida, fixada em formol 10% em PBS e processadas para inclusão em parafina. Os cortes com cerca de 5µm de espessura foram corados em Hematoxilina e Eosina e analisados ao microscópio de luz, para análise qualitativa da evolução do reparo e quantitativa da neovascularização. Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon com nível de significância estabelecido em 95%. A análise estatística apresentou diferença significativa nos períodos de 2 dias ($p=0,0021$) e 5 dias ($p=0,0032$), na redução da área da lesão no grupo experimental quando comparado ao controle. No período de 7 dias não houve diferença estatística significativa ($p=0,1615$) na área da lesão entre os grupos. Macroscopicamente, as lesões do grupo experimental até 96hs apresentaram aspecto de cicatrização melhor. A análise histológica qualitativa das lesões dos animais controle aos 2 e 5 e 7 dias apresentaram conjuntivo com fibras colágenas delgadas entre fibroblastos com morfologia estrelada, plasmócitos, macrófagos, linfócitos e predomínio de polimorfonucleares. Nos

animais experimentais houve maior número de vasos neoformados e hiperêmicos, a maioria contendo polimorfonucleares. O conjuntivo apresentou fibras colágenas menos delgadas e mais organizadas, apresentando predomínio de fibroblastos fusiformes e paralelos à superfície. A análise estatística não mostrou diferença significativa na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle e experimental, nos períodos de 2 dias (0,053), 5 dias (0,535) e 7 dias ($p=0,522$). Os resultados obtidos sugerem que a utilização do humor vítreo do Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) em lesões cutâneas de *Ratus norvergicus* acelerou o processo de cicatrização, promovendo um melhor aspecto na reparação tecidual.

1. Introdução

1.1. Histologia da Pele

A pele é o maior órgão humano e tem como principal função o revestimento externo e conseqüente proteção do corpo contra radiações e invasão biológica, além de regular a passagem de material interno e externo (EBLING, 1992). A pele também tem o importante papel de prevenir a perda de líquidos, proteínas e sangue, bem como manter a termorregulação, sintetizar vitamina D e converter esteróides (EBLING, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Durante a evolução dos organismos, apesar da diferenciação anatômica, certos elementos constituintes da pele são encontrados conservados nos diferentes grupos de seres vivos. O colágeno, uma proteína estrutura comum em vertebrados, é o principal constituinte da cutícula do *Ascaris lumbricoides* e alguns peixes apresentam queratina com função de proteção em sua pele, assim como em mamíferos (CRUVINEL, 2000).

A pele de todos os vertebrados apresenta-se constituída basicamente por uma epiderme e derme subseqüente (EBLING, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A epiderme é constituída de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo responsável pela relativa impermeabilidade da pele e pela proteção contra o atrito. Suas células são renovadas a partir da camada basal. Além dos queratinócitos, o epitélio apresenta melanócitos, células responsáveis pela formação da melanina, que pigmenta a pele; células de Langerhans, apresentadoras de antígeno; e células de Merkel, células neuroepiteliais. A espessura epitelial varia de acordo com o local estudado e sua renovação é constate, sendo, no caso da epiderme humana, substituída a cada 20 a 30 dias (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A derme é o tecido conjuntivo subjacente à epiderme e também apresenta espessura variável de acordo com a região, atingindo um máximo de 3mm na planta do pé em humanos. A derme desempenha funções de sustentação, preenchimento, defesa e nutrição da pele. As funções de sustentação e preenchimento são dadas pelas diversas fibras e substância fundamental que constituem a matriz extracelular. O papel da derme na nutrição da pele decorre da sua íntima associação com vasos sanguíneos. A derme contribui ainda para a defesa do organismo através de células como, macrófagos, plasmócitos, mastócitos e leucócitos. Essas células apresentam-se em maior quantidade na derme quando nesta instala-se inflamação. Também estão presentes na derme células adiposas e células mesenquimais, estas auxiliam na reparação tecidual (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A matriz extracelular da derme tem aspecto gelatinoso e é composta por macromoléculas alongadas, tais como as glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. Estas são muito hidratadas e formam um esqueleto entrelaçado e ligado às fibras do conjuntivo e a receptores de membrana denominados integrinas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A rede complexa de macromoléculas apresenta as funções de seqüestrar água, mantendo o turgor dos tecidos moles, reter minerais mantendo o enrijecimento dos tecidos esqueléticos, armazenar fatores de crescimento, controladores da proliferação celular e dar condições às células para aderir e migrar (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; PEREIRA, 1999).

As macromoléculas da matriz extracelular são representadas por: proteínas estruturais fibrosas como o colágeno, que forma as fibras colágenas e reticulares, e a elastina, que forma as fibras elásticas; glicoproteínas de adesão, como a fibronectina e a laminina; sulfatos de condroitina, queratana, dermatana e heparana (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; PEREIRA, 1999).

Além das macromoléculas existentes na matriz extracelular outras proteínas, denominadas matricelulares, não atuam como proteínas estruturais, mas interagem com proteínas da matriz, receptores de superfície celular, fatores de crescimento, citocinas e proteases. As proteínas matricelulares são solúveis em água e muitas são ricas em cisteínas, como, a osteonectina, que contribui para o remodelamento tecidual em resposta a injúrias; as trombopontinas, inibidoras da angiogênese; osteopontinas, reguladoras da calcificação e mediadora da migração de leucócitos; e alguns membros da família das tenascinas, envolvidos na morfogênese e na modulação da adesão celular (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; CRUVINEL, 2000).

Na interface entre o epitélio e o conjuntivo existem muitas cunhas epiteliais e papilas dérmicas, com numerosos vasos sanguíneos, responsáveis pela coloração vermelha da pele. O conjuntivo da pele apresenta fibroblastos, macrófagos, mastócitos e um número significativo de linfócitos T (TEN CATE, 1998). A presença de linfócitos T é devida a potencial entrada de patógenos que a pele está sujeita (BAERT *et al*, 1996).

Pêlos são anexos da pele desenvolvidos por meio de invaginações da epiderme e são envolvidos por folículos pilosos. Estes são contornados na base pela papila dérmica, de origem mesodérmica. Feixes de músculos lisos denominados, músculos eretores dos pêlos, encontram-se inseridos na bainha conjuntiva do folículo e na camada papilar da derme (EBLING, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As glândulas também são anexos importantes da pele, sendo de três tipos: glândulas sebáceas ou holócrinas, as quais têm seus ductos desembocando na porção terminal dos folículos pilosos; sudoríparas merócrinas, encontradas, no homem, em quase todas as regiões anatômicas com localização na derme reticular profunda; e glândulas sudoríparas apócrinas situadas nas regiões das axilas, perianal e auréolas mamária, tendo sempre seus ductos desembocando num folículo piloso (CRUVINEL, 2000; JUNQUEIRA &

CARNEIRO, 2004). As secreções glandulares protegem inespecificamente contra patógenos na superfície cutânea, mantêm a termorregulação e geram odores com função de comunicação sócio-sexual (CRUVINEL, 2000; EBLING, 1992).

A hipoderme é formada por tecido adiposo unilocular unindo a derme aos órgãos subjacentes. Essa camada não é considerada parte da pele, tendo o papel de deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia e proporciona proteção contra o frio (CRUVINEL, 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A pele é nutrida por dois plexos arteriais e três venosos; o terceiro plexo situa-se na derme intermediária. Os vasos linfáticos iniciam-se com tubos de fundo cego na camada papilar da derme convergindo-se para um plexo entre as camadas papilar e reticular. Estes vasos emitem ramos para outro plexo localizado entre a derme e a hipoderme (CRUVINEL, 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A inervação da pele é do tipo autônoma, sendo colinérgica para as glândulas merócrinas e apócrinas e adrenergicas para as glândulas holócrinas, músculo liso e arteríolas. Na derme e na hipoderme localizam-se terminações neurais sensitivas que podem ser livres ou encapsuladas e apresentam a função de percepção do tato, da pressão, do calor e do frio (CRUVINEL, 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

1.2. Cicatrização da Pele

Quando ocorre alguma agressão, processos fisiológicos são desencadeados no intuito de recuperar a integridade tecidual, sendo a cicatrização um dos principais processos utilizados pelo organismo (BEVILACQUA *et al*, 1988; CONTRAN *et al*, 1996; TROWBRIDGE & EMILING, 1996).

O processo de cicatrização é uma seqüência de eventos moleculares e celulares que podem ser identificados como fenômenos teciduais pós-traumáticos que ocorrem devido ao desequilíbrio instalado após a injúria. Este processo de forma geral apresenta as seguintes etapas: inflamação; proliferação fibroblástica (fibroplasia); proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese); síntese de tecido conjuntivo; e reepitelização (CRUVINEL, 2000; HUNT, 1981).

De acordo com a extensão e grau de destruição produzidos pela injúria o processo de cicatrização pode ser por 1ª ou 2ª intenção. A cicatrização por 1ª intenção ocorre quando há perda mínima de tecido sendo mais rápida e com formação de cicatrizes menores. A fenda da lesão é estreita e a destruição tecidual nas bordas é menor (BOGLIOLO *et al*, 1994; CARDOSO, 2003). A cicatrização de 1ª intenção caracteriza-se por ser uma incisão simples que pode causar a morte de um pequeno número de células epidermais e de tecido conjuntivo com danos mínimos às estruturas anexas na derme. Ao lesar pequenos vasos sanguíneos causa hemorragia e o sangue extravasa pelo corte formando um coágulo rico em fibrina, ocupando o espaço entre as margens da lesão. A partir deste coágulo e do tecido lesado, surgem fatores quimiotáticos e vasoativos promovendo a exsudação de fagócitos do sangue para as margens da lesão (BOGLIOLO *et al*, 1994; CARDOSO, 2003).

Nas primeiras 24 horas surge uma pequena reação inflamatória nas bordas da lesão denominada fase de reação inflamatória aguda, ou exsudativa que se caracteriza pela exsudação de fluidos, depósito de fibrina e migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Em seguida, o coágulo sanguíneo é digerido por enzimas liberadas pela desintegração de neutrófilos (CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992). Nas 48 horas após a injúria o exsudato passa a ser constituído predominantemente de macrófagos que digerem a fibrina, matriz extracelular danificada, hemácias e restos celulares. As células lesadas, fibronectina

e enzimas lisossomais dos neutrófilos produzem fatores quimiotáticos para macrófagos (BOGLIOLO *et al*, 1994; CARDOSO, 2003).

No homem a regeneração epitelial começa a ser observada 18 a 24 horas depois da lesão, sendo a migração celular um dos primeiros sinais da reepitelização. Os queratinócitos migram a partir da borda apoiando-se em tecidos viáveis. Além disso, entre 24 e 36 horas após a lesão, um número aumentado de células da camada basal da epiderme passa a sofrer mitose e migra para a superfície do coágulo recompondo o epitélio. As células da camada basal também secretam componentes da membrana basal restaurando gradualmente a epiderme. Dentro de 48 horas a restauração epitelial da área lesada já pode ser observada sob forma de uma fina e contínua camada epitelial. Após alguns dias a proliferação epitelial ainda ocorre para que a epiderme possa se restabelecer por completo (CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992).

Na restauração da derme e do tecido subcutâneo ocorre a proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos, que formam o tecido de granulação, o qual recebe esse nome pela sua aparência macroscópica (CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992). A angiogênese também é responsável pela nutrição e oxigenação dos tecidos em cicatrização (CARDOSO, 2003). Após a exsudação dos fagócitos, há uma proliferação endotelial, seguida pelo crescimento de um tecido conjuntivo vascularizado com posterior preenchimento do espaço antes ocupado pelo coágulo, formando o tecido de granulação (CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992).

Concomitantemente a neovascularização os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo em reabsorção, e sintetizam os componentes da matriz extracelular. Estas células hipertrofiam, apresentando grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi proeminente, adquirindo morfologia de célula secretora entre 4 a 5 dias após a lesão. Cerca de 5 dias

após a injúria tecidual, o tecido de granulação preenche todo o espaço da lesão, e a epiderme já adquire sua espessura normal, inclusive com início de queratinização (BOGLIOLO *et al*, 1994; CARDOSO, 2003; MCGEE *et al*, 1992).

A cicatrização cutânea requer interações complexas entre grande variedade de tipos celulares para restaurar a integridade tecidual (RICHESS, 1996). Organismos patogênicos liberam antígenos a partir da destruição tecidual ativando mecanismos de defesa do organismo. Fagócitos mononucleares e polimorfonucleares, células “natural killer” (NK) e produtos da ativação do complemento fazem parte de mecanismos não específicos ativados para a recuperação tecidual. Além disso, um sistema de defesa específico é também ativado e inclui a formação de anticorpos por linfócitos B, ativação de linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (SCHAFFER & BARBUL, 1998). Leucócitos, como macrófagos, exercem papel central na transição entre a fase inflamatória e a formação do tecido de granulação na cicatrização (RICHESS, 1996). Os linfócitos não são requeridos para a iniciação deste processo, mas a resposta imune celular é essencial para a continuidade da reparação tecidual. Estas células estão presentes entre o infiltrado de células mononucleares e interagem com os macrófagos para regular a fase efetora da resposta inflamatória (BLISTEIN-WILLINGER, 1991).

Os mastócitos humanos têm a capacidade de influenciar a proliferação, produção de colágeno e atividade contrátil dos miofibroblastos no desenvolvimento de fibrose e nos estágios tardios da cicatrização (XU *et al*, 2002). Os miofibroblastos, por sua vez, são as principais células envolvidas na síntese dos componentes da matriz extracelular (LORENA *et al*, 2002).

Com o tempo, os vasos sanguíneos sofrem trombose, degeneram e são reabsorvidos. Os canais linfáticos também são observados no tecido de granulação e, assim como na circulação sanguínea, a circulação linfática é restabelecida. As células fagocitárias

vão se tornando cada vez mais raras e o tecido de granulação passa a ser constituído de tecido conjuntivo menos vascularizado e mais denso localizado abaixo da epiderme já estabelecida. Simultaneamente ocorre a contração da lesão. Tal fenômeno ocorre devido a característica contrátil que os fibroblastos adquirem, agora miofibroblastos, aproximando ainda mais as bordas da lesão. Na cicatrização por 1ª intenção a contração é pequena (CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992).

A cicatrização está consolidada por volta dos dez dias, em seguida há uma remodelação do colágeno para que o tecido adquira resistência máxima (BOGLIOLO *et al*, 1994; CARDOSO, 2003). Contudo, mesmo após meses depois da regeneração tecidual os tecidos lesados nunca terão a mesma resistência a forças tensoras de tecidos não lesados (BOGLIOLO *et al*, 1994; McGEE *et al*, 1992; CARDOSO, 2003).

Quando há maior perda de tecido e as lesões formadas são abertas, ou seja, não se faz o fechamento imediato da lesão, a cicatrização é denominada secundária ou por 2ª intenção. A formação de tecido de granulação, fibrose e cicatriz são muito mais visíveis que na cicatrização por 1ª intenção. Os dois tipos de cicatrização apresentam os mesmos mecanismos básicos, porém o processo de reparação de cicatrizes abertas é mais lento. Sendo as diferenças mais quantitativas que qualitativas (CRUVINEL, 2000; CARDOSO, 2003; McGEE *et al*, 1992).

Assim como em cicatrização por 1ª intenção a lesão causa hemorragia e formação de coágulo rico em fibrina e fibronectina, seguidos pela migração de polimorfonucleares e depois de macrófagos (BOGLIOLO *et al*, 1994).

A contração e a epitelização são considerado os dois eventos fundamentais na cicatrização por 2ª intenção, sendo que em menos de 24 horas ocorre a migração epitelial. O tecido de granulação origina-se do tecido conjuntivo circunjacente fazendo saliência na superfície da lesão. Os fibroblastos são essenciais para a indução da formação do tecido de

granulação, o qual se forma entre o terceiro e o quarto dia após a lesão (CRUVINEL, 2000).

Os queratinócitos adquirem caráter migratório e, a partir das bordas da lesão, formam uma camada celular contínua. Neste momento, as células se tornam estacionárias e passam a produzir componentes da membrana basal (CARDOSO, 2003). A função de contração é dos miofibroblastos, que contêm quantidades consideráveis de actina e miosina, que interagem para gerar contração (BOGLIOLO *et al.*, 1994; CARDOSO, 2003). A cicatriz tecidual que cobre a lesão é caracterizada por bandas de colágeno paralelas à superfície da pele e pequenos vasos sanguíneos dispostos perpendicularmente entre a epiderme e a derme (McGEE *et al.*, 1992). Estruturas anexas são quase sempre ausentes nas cicatrizes de pele. O fechamento da lesão ocorre de maneira bem mais lenta que na cicatrização por 1ª intenção podendo demorar duas semanas ou mais. Quando há o fechamento da lesão ocorre o fenômeno denominado apoptose, ou morte celular programada, remodelando o tecido de granulação, degradando matriz extracelular e diminuindo a celularidade tecidual (CARDOSO, 2003; CRUVINEL, 2000). Assim com em cicatrização primária a resistência da cicatriz aumenta de acordo com a remodelação das fibras de colágeno. As cicatrizes sofrem retração e remodelamento em graus variáveis podendo diminuir ou mesmo desaparecer (BOGLIOLO *et al.*, 1994).

1.3. Produtos naturais utilizados para a cicatrização

O conhecimento sobre mecanismos básicos de cicatrização tem evoluído rapidamente, devido à importância desse processo na manutenção da integridade tecidual. Ao longo do tempo, as pesquisas levaram a uma nova época em que se pretende interferir na biologia molecular, influenciando a síntese de substâncias envolvidas nos eventos de

reparação (BEVILACQUA *et al*, 1988). Desde a antiguidade existem registros de produtos naturais utilizados em lesões com o objetivo de promover a otimização da cicatrização com reduzida contaminação. Este fato veio se difundindo até os dias atuais e os cientistas e ecologistas continuam na incessante busca por novos medicamentos (CÉSAR, 1998).

As ervas medicinais foram utilizadas como uma das primeiras intervenções farmacológicas na cura de lesões e, atualmente, 25% das drogas utilizadas são derivadas das plantas (BEGERON & WYNN, 1996).

A eficácia do uso do açúcar granulado no tratamento de lesões infectadas já foi constatada por Seal & Middleton (1991), que observaram que a pasta de açúcar reduzia a água da lesão inibindo o crescimento bacteriano e ainda, obteve sucesso na cicatrização das lesões.

O óleo de copaíba foi utilizado em estudos de reparação tecidual em camundongos (*Mus musculus*) e foi demonstrada eficácia no auxílio da cicatrização de lesões cutâneas (EURUDES *et al*, 1998).

Uma solução a base de muco (“baba”) de Escargot (*Helix aspersa maxima*) liofilizado foi utilizado no tratamento de lesões cutâneas e foi constatado que houve aceleração no processo de regeneração da pele (CÉSAR, 1998).

O mel, produto natural de abelhas africanas, foi utilizado na regeneração de lesões cutâneas de *ratus norvergicus* e foi observado aumento significativo na contração da lesão, menor formação de tecido de granulação e aceleração no processo de angiogênese, demonstrando sua eficácia na reparação tecidual (OSUAGWU *et al*, 2004).

No México tem-se testado diversos biomateriais tais como cerâmicas enriquecidas com zinco e cálcio em diferentes porcentagens para tratar lesões cutâneas em *ratus norvergicus*. A análise histológica demonstrou que houve melhora no processo de

restabelecimento da pele nos ratos que receberam tratamento com cerâmica enriquecida com Zn e Ca(OH)_2 (PINA-BARBA *et al.*, 2004).

Na Índia utilizou-se uma membrana de colágeno enriquecida com curcumim para reparação tecidual. A membrana enriquecida também atuou como uma matriz, um suporte para que ocorresse a regeneração da pele. Os animais que foram tratados com a matriz de colágeno enriquecida de curcumim apresentaram uma proliferação mais eficiente quando comparados com os animais somente tratados com o filme de colágeno. Acredita-se que tal resultado se deva ao fato de que o curcumim quando incorporado na matriz de colágeno mantém a estabilidade hidrotermal o que não acontece nos filmes de colágeno normais (GOPINATH *et al.*, 2004).

Uma solução feita à base de casca de *butea monosperma*, uma árvore comum na Índia, foi utilizada no intuito de melhorar a cicatrização de lesões em ratos de linhagem Winstar. O extrato aumentou a proliferação celular e a síntese de colágeno na lesão. Além disso, houve maior reepitelização e contração da lesão, o que foi constatado ao se estimar a quantidade de colágeno produzida no tecido de granulação e por meio da análise histológica da lesão (SUMITRA, MANIKANDAN, SUGUNA, 2005).

Uma pomada formulada a base de *Celosia argentea*, uma árvore utilizada tradicionalmente em medicina alternativa na cura de úlceras, foi utilizada com o intuito de intensificar a cicatrização de queimaduras. O extrato de *Celosia argentea* acelerou o processo de reparo, provavelmente por apresentar ação mitogênica, atuando principalmente na resposta celular de dois tipos celulares, os fibroblastos e os queratinócitos (PRIYA *et al.*, 2004).

1.4. Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*, lacepede, 1803, Pimeloidae)

O Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) pertence ao filo Chordata, classe osteichthes, subclasse Teleostei, ordem Siluriformes e família Pimeloidae. É um peixe de médio porte, chegando a medir 40 cm e pesar 3 kg. Seu corpo é alto e a cabeça é curta e baixa, com a boca terminal e a fenda bucal ampla, não possuindo dentes no palato. Os barbilhões maxilares são longos, alcançando a região do pedúnculo caudal. O dorso é cascalho-escuro, com três a quatro séries longitudinais de manchas negras sobre o flanco. As nadadeiras possuem manchas negras e pequenas. Este animal apresenta esporões em suas nadadeiras peitorais e dorsal, nos quais há muco tóxico (PAPAVERO, 1994; GOMIERO, 1996).

O gênero *Pimelodus* sp como a maioria dos peixes de couro é bentônico, habitando o fundo dos ambientes aquáticos (ALVES, 1998). Estes peixes são de piracema, fazendo a migração reprodutiva rio acima para a desova, que ocorre por volta de fevereiro com a elevação do nível da água devido às chuvas. Apresenta em sua primeira maturação sexual o comprimento médio de 12,5 a 18 cm para machos e 12,19 cm para fêmeas (SATO & GODINHO, 1988). É um peixe onívoro e alimenta-se de larvas bentônicas de insetos, algas, moluscos, peixes e fragmentos vegetais. Acumulam gordura no inverno que será utilizada para a maturação das gônadas, para a reprodução no verão (ALVES, 1998).

O Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) é um peixe capturado a ano todo, em poços de rios, sendo importante para a pesca uma vez que sua carne é muito utilizada na alimentação.

O conhecimento popular aconselha, quando ocorre ferimento pelo esporão do Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), que se friccionem na lesão o olho do animal,

expelindo o humor vítreo, a fim de aliviar a dor lancinante e favorecer a cicatrização (NOMURA, 1996).

O olho dos vertebrados apresenta uma forma aproximadamente esférica, com função de promover a visão. A córnea cobre a porção anterior do globo, ela é um tecido transparente de alto poder refratário e é contornada por uma fina película lacrimal contendo, por exemplo, a lisozima, uma enzima bacteriolítica. A parte posterior do globo é protegida pela esclera, um revestimento que não é diretamente envolvido no processo de visão. O interior do olho é essencialmente composto por três constituintes: câmara anterior (preenchida por humor aquoso), cristalino e corpo vítreo (preenchido por humor vítreo). A luz é capaz de atravessar esse meio transparente, finalmente atingindo a retina, a qual é o centro do processo visual. (DURCHSCHLAG *et al*, 1999).

O corpo vítreo é preenchido por um gel (humor vítreo) claro e altamente viscoso, que ocupa cerca de 90% do volume total do olho, promovendo o suporte estrutural do olho e a absorção de choques. Os principais constituintes do humor vítreo são água (99%), fibrilas colágenas e, especialmente, ácido hialurônico, algumas substâncias de baixo peso molecular, tais como, eletrólitos (NaCl), ácido ascórbico, uréia, glicose e lactato e proteínas (tabela 1) (DURCHSCHLAG *et al*, 1999). Estas podem ser divididas em proteínas estruturais, como, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas; e proteínas não estruturais denominadas proteínas organizadoras ou matricelulares (CRUVINEL, 2000).

A cicatrização de lesões está diretamente ligada às proteínas, uma vez que estas participam de todas as fases do processo de reestruturação tecidual, desde a ativação da cascata de coagulação por enzimas até a contração da lesão e sua epitelização por meio da adesão e migração celular. Tanto as proteínas estruturais como as matricelulares estão envolvidas no processo de reparação tecidual de todos os tipos de tecido (CRUVINEL, 2000).

A procura por substâncias protéicas para evitar infecção local, acelerar a eliminação dos tecidos mortos e induzir o fechamento das lesões sempre foi uma preocupação constante no meio científico (CESAR, 1998).

O Mandi é um peixe pouco pesquisado, não havendo na literatura nenhum estudo a respeito do poder analgésico, cicatrizante bem como a caracterização bioquímica de seu humor vítreo, sendo este uma fonte inexplorada de proteínas.

2. Objetivo

Este estudo teve como objetivo realizar avaliação macroscópica e microscópica do processo de reparo de lesões cutâneas em *Ratus norvegicus*, após a utilização do humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*).

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção de humor vítreo

Neste estudo foram utilizados 75 *Pimelodus maculatus* (Mandi-amarelo) provindos do Rio Paranaíba, da cidade de Cascalho Rico-GO (Figura 1). Os animais foram mantidos em quarentena no tanque do Departamento de Citogenética da Universidade Federal de Uberlândia. Após esse período, os animais foram sacrificados, o humor vítreo retirado e diluído em PBS 0,1M pH:7,2 na proporção de 1:1.

3.2. Animais Experimentais

Neste estudo foram utilizados 60 *Ratus norvegicus* (Winstar) adultos machos, com 8 a 12 semanas, mantidos no biotério da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condições de isolamento em gaiolas individualizadas, com água e comida *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para os procedimentos cirúrgicos os *Ratus norvegicus* foram anestesiados, por via intra-peritoneal com solução de Tiopental sódico 20ml/g (thionembutal, Abbott), 0,002 ml/g de peso corporal. Em seguida, na pele dorsal dos animais, foi realizada tricotomia e produzida uma lesão circular em uma área previamente demarcada, com cerca de 1,0 cm de diâmetro (Figura 2).

Os animais foram divididos em dois grupos: experimental e controle. Logo após a cirurgia e a cada 24 horas, durante sete dias, foi administrado nas lesões 75µl de solução de humor vítreo de Mandi-amarelo em tampão PBS 0,1 M no grupo experimental e apenas PBS 0,1M no grupo controle.

3.3. Análise Macroscópica da evolução das lesões

As lesões produzidas foram medidas diariamente com auxílio de um paquímetro. A área da lesão foi calculada utilizando a fórmula matemática para cálculo de área de elipse ($A= 0,79ab$, onde a corresponde ao diâmetro maior e b corresponde ao diâmetro menor). Quando as lesões apresentavam área circular foi utilizada a fórmula matemática para cálculo de área do círculo ($A= 3,142r^2$, onde r corresponde ao raio do diâmetro da lesão). Para cada um dos períodos estudados (2, 5 e 7 dias) foi calculada a redução da lesão (área final – área inicial) em porcentagem. Os dados foram analisados no teste χ^2 para definir se eram normais ou não-normais. Uma vez definidos como não-normais os dados foram analisados por um teste não paramétrico, denominado teste de Wilcoxon com nível de significância estabelecido em 95%.

Características como coloração, formação de exsudato, umidade e formação de casca também foram observadas nos grupos controle e experimental.

3.4. Análise Histológica – Evolução microscópica da lesão

Ao final de 2, 5 e 7 dias, dez animais de cada grupo foram sacrificados. A região da lesão na pele dorsal foi removida e fixada a placas de parafina, com o auxílio de alfinetes permanecendo distendida (CONCEIÇÃO, 2004). Este conjunto foi imerso em formol 10%

em PBS 0,1M por 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e processadas pela técnica de rotina para inclusão em parafina. Os cortes semi-seriados com cerca de 5 μ m de espessura, foram corados em Tricrômico de Mallory ou Hematoxilina e Eosina e analisados ao microscópio de luz.

Os vasos sanguíneos foram quantificados nos cortes corados em HE, utilizando objetiva de 10X. Em cada corte histológico foram considerados 5 campos microscópicos, sendo analisadas 20 lâminas de cada animal. Os dados foram analisados utilizando o Teste Wilcoxon com nível de significância estabelecido em 95%.

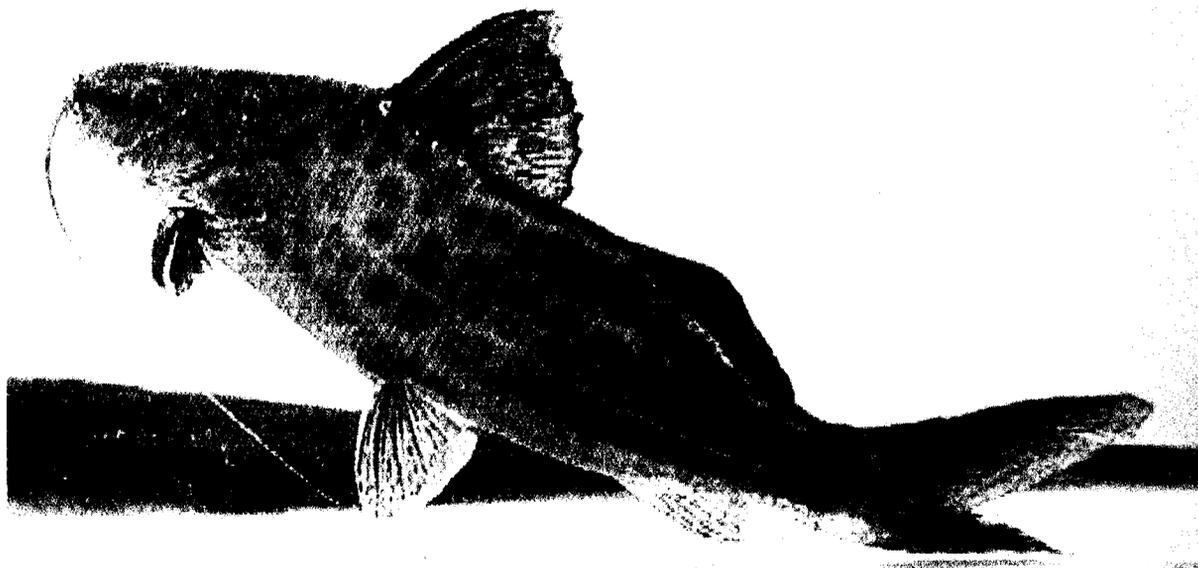


Figura 01. Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) fonte: CEMIG/CETEC, 2000.

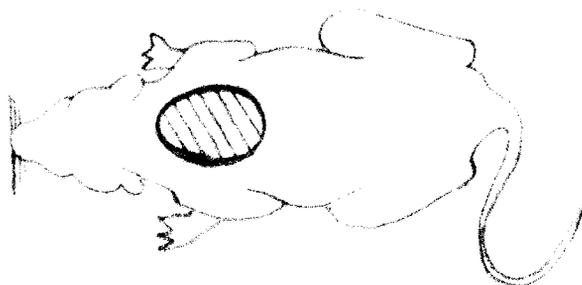


Figura 02. Desenho esquemático mostrando o local da lesão na região dorsal do animal (*Ratus norgergicus*).

4. Resultados

4.1. Análise macroscópica da evolução das lesões

4.1.1. Análise qualitativa

Vinte e quatro horas (1 dia) de pós-operatório as lesões dos animais do grupo experimental apresentaram aspecto melhor de cicatrização em relação aos animais controle. As lesões mostraram-se mais secas, com pouca produção de exsudato, coloração rósea e tendendo à formação de casca. Enquanto as lesões dos animais do grupo controle apresentaram aspecto umidificado, com grande produção de exsudato, coloração esbranquiçada e sem tender à formação de crosta.

Quarenta e oito horas (2 dias) de pós-operatório as diferenças observadas no primeiro dia continuaram sendo evidentes entre os grupos experimental e controle. Na maioria dos animais do grupo experimental as lesões não apresentaram exsudato e já se observava crosta com aspecto seco e coloração rósea. As lesões dos animais controle continuaram apresentando aspecto umidificado, coloração esbranquiçada e sem formação de casca, com uma pequena redução do exsudato.

Setenta e duas horas (3 dias) de pós-operatório as lesões dos animais do grupo experimental apresentaram aspecto seco, sem exsudato, coloração vermelho-claro e crosta mais evidente. As lesões dos animais controle apresentaram-se menos umidificadas, com redução do exsudato, coloração castanho-claro e tendendo à formação de crosta.

Noventa e seis horas (4 dias) de pós-operatório as lesões tanto dos animais do grupo controle quanto dos animais do grupo experimental apresentaram aspecto seco, sem produção de exsudato, coloração castanho escuro e crosta. A partir desse período não foram observadas diferenças evidentes entre os grupos.

4.1.2. Análise quantitativa

A análise estatística apresentou diferença significativa nos períodos de 2 dias, ($p=0,0021$) e 5 dias ($p=0,0032$), na redução da área da lesão no grupo experimental quando comparado ao controle (Tabela 1 e 2). No período de 7 dias não houve diferença estatística significativa ($p=0,1615$) na área da lesão entre os grupos controle e experimental (Tabela 3).

Tabela 1 - Área total da lesão no tempo zero (lesão inicial) e em dois dias, nos grupos controle (Cont) e experimental (Exper).

Animal	Lesão inicial (mm ²)		2 dias (mm ²)		Redução da lesão (mm ²)		Redução da lesão (%)	
	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper
1	7,11	6,32	5,53	5,03	1,58	1,29	22,22	20,41
2	6,36	7,11	6,36	5,58	0	1,53	0	21,51
3	7,11	8,53	7,11	7,11	0	1,42	0	16,64
4	7,11	7,78	6,36	5,58	0,75	2,2	10,54	28,27
5	7,11	8,53	6,36	5,58	0,75	2,95	10,54	34,58
6	8,7	8,69	8,7	7,86	0	0,83	0	9,55
7	9,56	7,11	8,7	5,53	0,86	1,58	8,99	22,22
8	7,11	7,11	6,88	3,79	0,23	3,32	3,23	46,69
9	7,86	8,7	7,86	4,98	0	3,72	0	42,75
10	10,43	7,11	8,53	5,53	1,9	1,58	18,21	22,22
Média	7,85	7,70	7,24	5,66	0,61	2,04	7,37	26,48

Área da lesão em mm² dos animais controle e experimental no período de 2 dias pós-operatório. Lesão inicial (mm²): área da lesão produzida na cirurgia; 2 dias (mm²): área da lesão aos 2 dias pós-operatório; Redução da lesão (mm²): redução absoluta da área da lesão; Redução da lesão (%): Redução em porcentagem da área da lesão.

Tabela 2 - Área total da lesão no tempo zero (lesão inicial) e em cinco dias, nos grupos controle (Cont) e experimental (Exper).

Animal	Lesão inicial (mm ²)		5 dias (mm ²)		Redução da lesão (mm ²)		Redução da lesão (%)	
	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper
1	6,36	6,32	3,32	3,32	3,04	3	47,79	47,46
2	5,69	5,52	4,42	2,83	1,27	2,69	22,31	48,73
3	6,7	7,82	5,03	5,03	4,36	2,79	24,92	35,67
4	5,69	7,11	3,32	4,42	2,37	2,69	41,65	37,83
5	5,69	6,36	4,42	3,32	1,27	3,04	22,31	47,79
6	6,36	7,86	4,42	3,85	1,94	4,01	30,5	50,95
7	6,32	7,86	3,79	3,85	2,53	4,01	40,03	50,95
8	6,36	5,72	3,79	2,83	2,57	2,89	40,4	50,52
9	6,36	9,48	5,03	5,03	1,33	4,45	20,91	46,94
10	6,36	7,11	4,42	1,96	1,94	5,15	30,5	72,43
Média	6,19	7,12	4,20	3,64	2,26	3,47	32,13	48,93

Área da lesão em mm² nos animais controle e experimental no período de 5 dias pós-operatório. Lesão inicial (mm²): área da lesão produzida na cirurgia; 5 dias (mm²): área da lesão aos 5 dias pós-operatório; Redução da lesão (mm²): redução absoluta da área da lesão; Redução da lesão (%): Redução em porcentagem da área da lesão.

Tabela 3 - Área total da lesão no tempo zero (lesão inicial) e em sete dias, nos grupos controle (Cont) e experimental (Exper).

Animal	Lesão inicial (mm ²)		7 dias (mm ²)		Redução da lesão (mm ²)		Redução da lesão (%)	
	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper	Cont	Exper
1	8,53	7,82	2,82	2,83	5,71	4,99	66,94	63,81
2	6,36	6,32	2,82	2,83	3,54	3,49	55,66	55,22
3	6,36	7,85	2,37	2,83	3,99	5,02	62,73	63,94
4	6,36	7,85	2,37	2,83	3,99	5,02	62,73	63,94
5	6,86	7,11	1,96	1,26	4,9	5,85	71,42	77,91
6	4,42	6,32	1,26	1,19	3,16	5,13	71,49	81,17
7	4,42	7,85	1,58	1,19	2,84	6,66	64,25	84,84
8	7,86	7,11	2,37	1,26	5,49	4,15	69,84	82,27
9	5,69	7,85	1,96	1,19	3,73	6,66	65,55	84,84
10	6,86	10,4	2,82	1,96	4,04	8,44	65,45	81,15
Média	6,37	7,65	2,23	1,94	4,14	5,54	65,61	73,91

Área da lesão em mm² nos animais controle e experimental no período de 7 dias pós-operatório. Lesão inicial (mm²): área da lesão produzida na cirurgia; 7 dias (mm²): área da lesão aos 7 dias pós-operatório; Redução da lesão (mm²): redução absoluta da área da lesão; Redução da lesão (%): Redução em porcentagem da área da lesão.

4.2. Análise Histológica – Evolução microscópica da lesão

4.2.1. Dois dias pós-operatório

No período de dois dias pós-operatório, o grupo controle apresentou crosta fibrinoleucocitária cobrindo toda a superfície da lesão com presença de piócitos. A reepitelização demonstrou-se pouco significativa (Figura 5A e 6A).

O conjuntivo apresentou tecido de granulação imaturo com infiltrado inflamatório caracterizado pela presença de grande número de polimorfonucleares e mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos). Também foi observada presença de fibroblastos imaturos com morfologia estrelada, núcleo grande e claro, situados entre trama de fibras colágenas delgadas e espaçadas e grande quantidade de substância fundamental amorfa. O conjuntivo mostrou um grande número de vasos sanguíneos neoformados e hiperêmicos com leucócitos marginalizados (Figura 5A e 6A).

O grupo experimental apresentou tecido fibrinoleucocitário, reepitelização e tecido conjuntivo semelhante ao grupo controle (Figura 5B e 6B).

A análise estatística não mostrou diferença significativa ($p=0,053$) na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle e experimental (Tabela 4).

4.2.2. Cinco dias pós-operatório

No período de cinco dias pós-operatório o grupo controle apresentou crosta fibrinoleucocitária cobrindo toda a superfície da lesão com presença de piócitos e a reepitelização mostrou-se mais evidente. Foi observada a presença de fibroblastos com morfologia fusiforme, adjacentes ao tecido fibrinoleucocitário, alinhados e paralelos à superfície da lesão, entre muitos capilares (Figura 7A e 8A).

O tecido conjuntivo apresentou tecido de granulação na fase proliferativa com infiltrado inflamatório menos intenso com presença de polimorfonucleares e mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos). Também foi observada presença de fibroblastos grandes com morfologia estrelada, núcleo grande e claro e com prolongamentos citoplasmáticos entremeados a fibras colágenas delgadas e espaçadas e grande quantidade de substância fundamental amorfa. Ainda foi observada presença de um grande número de vasos sanguíneos neoformados e hiperêmicos com leucócitos marginalizados (Figura 7A e 8A).

O grupo experimental apresentou aparentemente reepitelização mais avançada em relação ao grupo controle. O infiltrado inflamatório mostrou-se menos intenso em relação ao controle (Figura 7B e 8B).

O conjuntivo apresentou predomínio de fibroblastos fusiformes e núcleo escuro, alinhados paralelamente, tornando-se mais organizados em direção ao centro da lesão. Foram observados fibroblastos grandes com morfologia estrelada, núcleo grande e claro e com prolongamentos citoplasmáticos, no entanto, em menor quantidade quando comparado com o controle. Havia presença de fibras colágenas delgadas e espaçadas em meio à substância fundamental amorfa, porém, aparentemente mais organizadas e em maior quantidade que no grupo controle. Presença de um maior número de vasos sanguíneos neoformados e/ou hiperêmicos que no grupo controle.

A análise estatística não mostrou diferença significativa ($p=0,535$) na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle e experimental (Tabela 4).

4.2.3. Sete dias pós-operatório

No período de sete dias pós-operatório, o grupo controle apresentou crosta fibrinoleucocitária cobrindo toda a superfície da lesão com presença de piócitos. A reepitelização não se mostrou muito avançada em relação ao grupo experimental. Presença de fibroblastos com morfologia fusiforme, adjacentes ao tecido fibrinoleucocitário, alinhados e paralelos à superfície da lesão e, dispostos entre muitos capilares, contudo, mais organizados e em maior número de células atingindo toda a superfície da lesão. O tecido de granulação na fase proliferativa apresentou infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, apresentando polimorfonucleares e mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos). Apresentou predomínio de fibroblastos fusiformes e núcleo escuro, alinhados paralelamente, tornando-se mais organizados quanto mais próximos do centro da lesão. Também foram observados fibroblastos grandes com morfologia estrelada, núcleo grande e claro e com prolongamentos citoplasmáticos, no entanto, em menor quantidade quando comparado ao controle no período de 5 dias. Presença de fibras colágenas delgadas e espaçadas em meio à substância fundamental amorfa, mas, aparentemente mais organizadas e em maior quantidade que no grupo controle de 5 dias. Presença de vasos sanguíneos neoformados e/ou hiperêmicos com leucócitos marginalizados em menor número que nos grupos do período de 5 dias (Figura 9A e 10A).

No grupo experimental houve a presença de fibroblastos fusiformes adjacentes ao tecido fibrinoleucocitário, alinhados e paralelos, preenchendo a superfície da lesão em uma extensão maior em relação ao grupo controle. O tecido de granulação apresentou-se ainda na fase proliferativa, porém, o infiltrado inflamatório apresentou menor número de polimorfonucleares e mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos). Houve o predomínio de fibroblastos fusiformes com núcleo escuro, alinhados paralelamente, junto a

fibras colágenas menos delgadas e espaçadas do que o observado no grupo controle de 7 dias e organizadas de forma a preencher toda a lesão. Presença de vasos sanguíneos neoformados e/ou hiperêmicos em menor número que no grupo experimental do período de 5 dias (Figura 9B e 10B).

A análise estatística não mostrou diferença significativa ($p=0,522$) na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle e experimental (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantidade de vasos sanguíneos nos grupos controle e experimental nos diferentes períodos.

Animal	2 dias		5 dias		7 dias	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental	Controle	Experimental
1	291	456	183	162	257	209
2	154	174	135	164	225	336
3	141	200	212	131	209	156
4	204	419	269	281	101	222
5	169	268	129	260	200	200
6	136	168	243	291	167	243
7	98	278	163	211	171	193
Média	170,43	280,43	190,57	214,29	190	222,71

Vasos sanguíneos contados em objetiva de 10X; 5 campos; 20 lâminas da cada animal

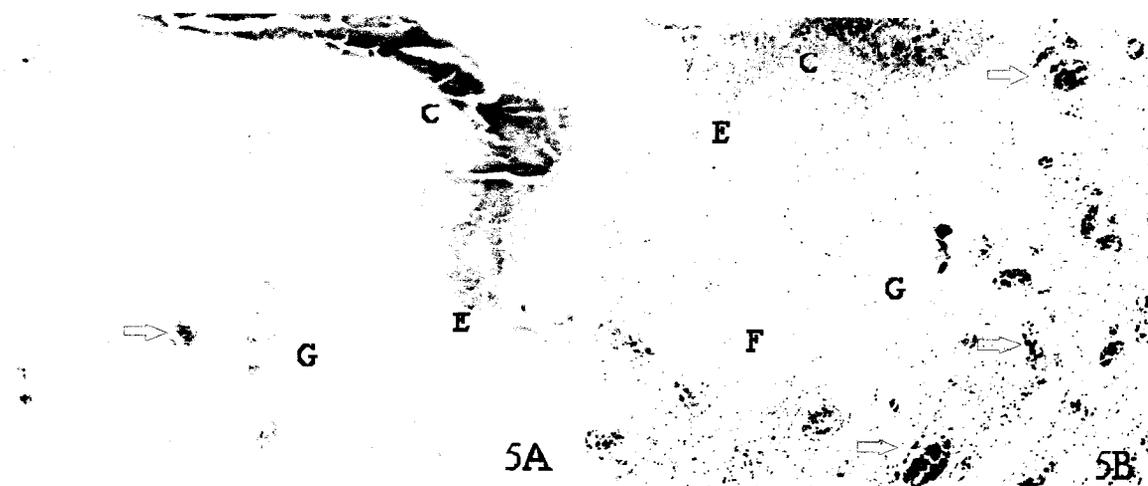


Figura 5 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de dois dias, apresentando crosta fibrinoleucocitária (C), reepitelização insignificante (E); tecido de granulação (G) na fase inflamatória com fibras colágenas delgadas (F) e vasos neoformados e hiperêmicos (\Rightarrow). Aumento de 97X, HE.

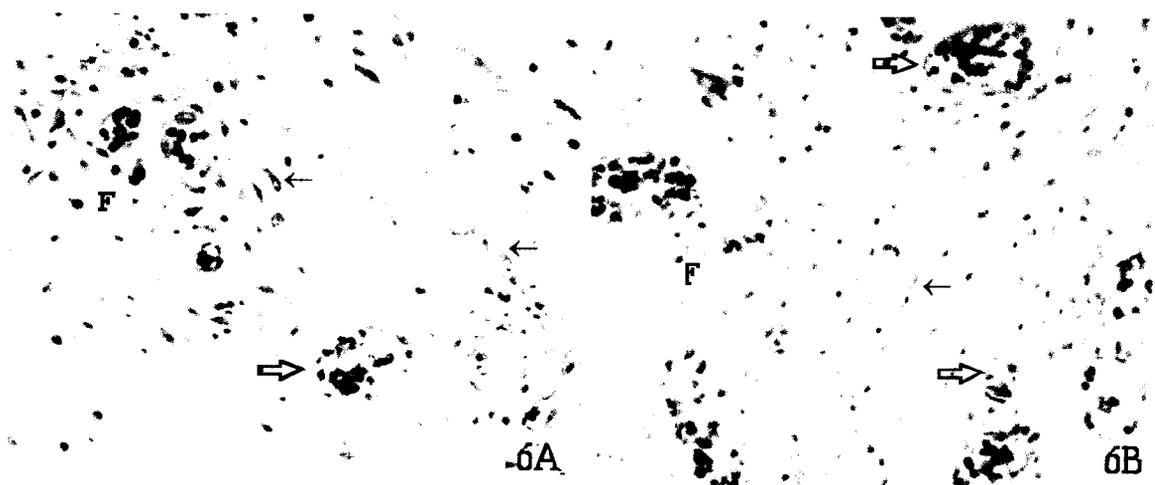


Figura 6 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de dois dias, presença de fibroblastos imaturos com núcleos grandes, claros e com prolongamentos citoplasmáticos (\rightarrow); vasos sanguíneos neoformados com parede delgada e leucócitos marginalizados (\Rightarrow). Células do infiltrado inflamatório entre fibras colágenas delgadas e espaçadas (F) em meio a grande quantidade de substância fundamental amorfa caracterizando um tecido edemaciado. Nota-se maior número de vasos sanguíneos neoformados e células do infiltrado inflamatório no grupo experimental. Aumento de 387X, HE.

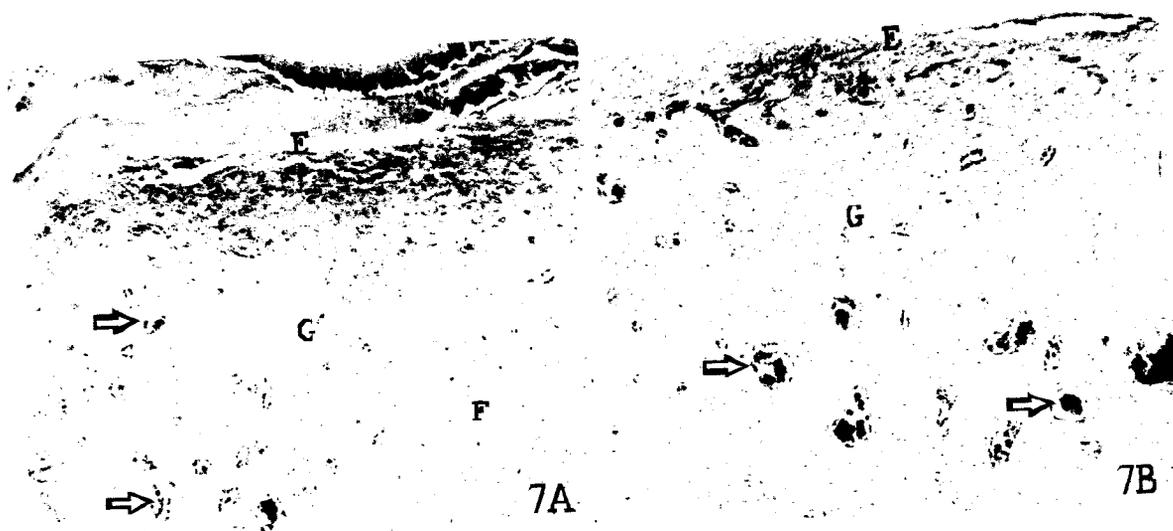


Figura 7 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de cinco dias, apresentando reepitelização (E) ocorrendo abaixo da crosta fibrinoleucocitária (C); tecido de granulação imaturo (G) na fase proliferativa ou inflamatória com presença de vasos sanguíneos hiperêmicos (=>) e células do infiltrado inflamatório em meio a fibras colágenas delgadas (F). Grupo experimental de cinco dias apresentando reepitelização (E) mais avançada; tecido de granulação (G) mais celularizado e organizado; e vasos sanguíneos (=>) em maior número e hiperêmicos. Aumento de 97X, HE.

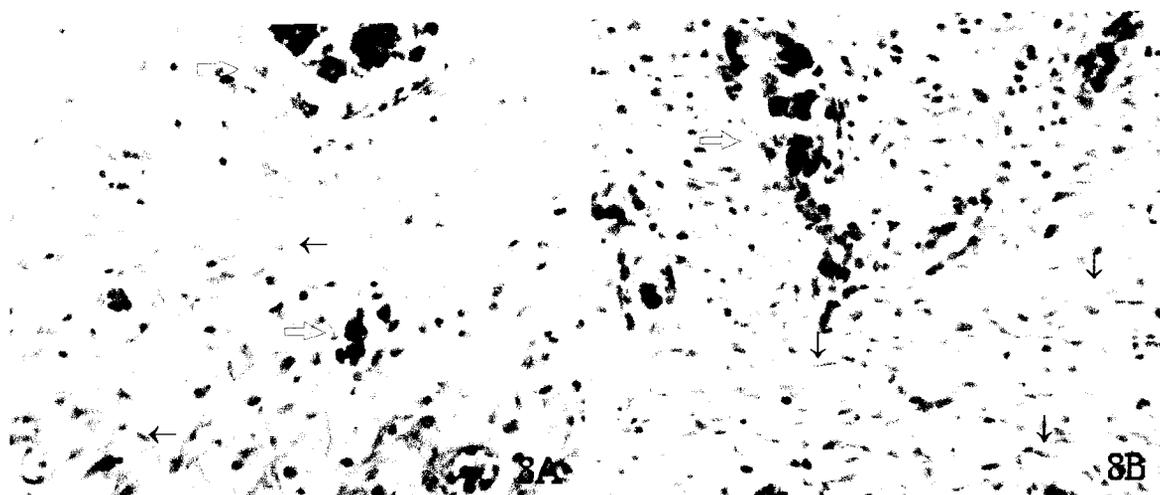


Figura 8 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de cinco dias, presença de fibroblastos imaturos com núcleos grandes, claros e com prolongamentos citoplasmáticos (→); vasos sanguíneos neoformados com parede delgada (=>) e leucócitos marginalizados. Células do infiltrado inflamatório entre fibras colágenas delgadas e espaçadas em meio a grande quantidade de substância fundamental amorfa. O grupo experimental com tecido de granulação mais organizado apresentando miofibroblastos caracterizados por morfologia fusiforme, núcleo pequeno e escuro dispostos paralelamente em meio a fibras colágenas em maior quantidade; presença de células do infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos neoformados com leucócitos marginalizados. Aumento de 387X, HE.

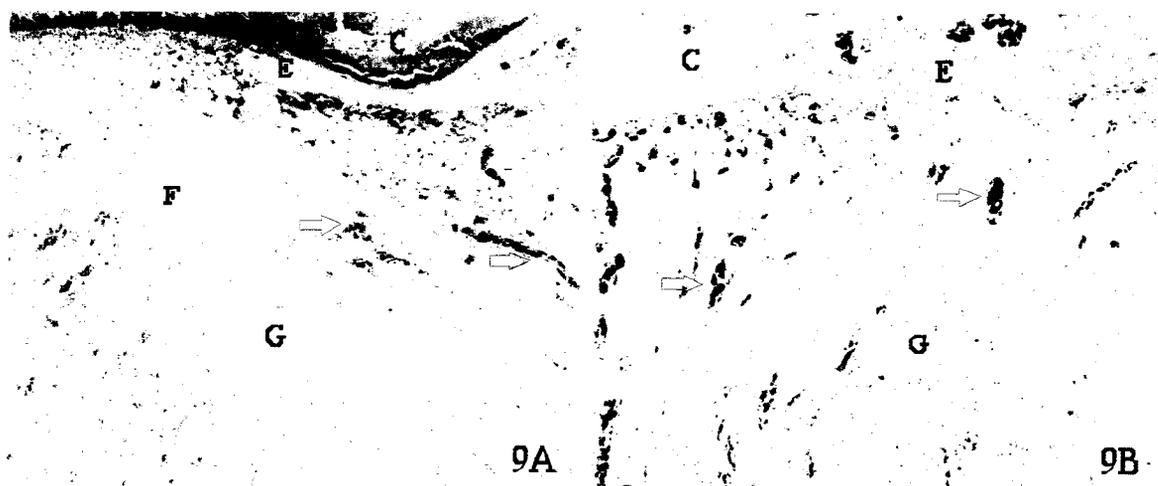


Figura 9 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de sete dias, apresentando reepitelização (E) ocorrendo abaixo da crosta fibrinoleucocitária (C); tecido de granulação imaturo (G) na fase proliferativa inflamatória com presença de vasos sanguíneos hiperêmicos (⇨) e células do infiltrado inflamatório em meio a fibras colágenas delgadas (F). Grupo experimental de sete dias apresentando reepitelização mais avançada (E); tecido de granulação (G) mais celularizado e organizado paralelamente à superfície da lesão; e vasos sanguíneos (⇨) em maior número e hiperêmicos. Aumento de 97X, HE.



Figura 10 - Grupos controle (A) e experimental (B) no período de sete dias, com presença de fibroblastos imaturos (→) com núcleos grandes, claros e com prolongamentos citoplasmáticos; vasos sanguíneos neoformados (⇨) com parede delgada e leucócitos marginalizados; menor quantidade de células do infiltrado inflamatório entre fibras colágenas delgadas e espaçadas (F) em meio a grande quantidade de substância fundamental amorfa. No grupo experimental presença de tecido de granulação maduro (G) mais celularizado e organizado apresentando miofibroblastos (→) caracterizados por morfologia fusiforme, núcleo pequeno e escuro dispostos paralelamente em meio a fibras colágenas em maior quantidade (F); presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos neoformados (⇨) com leucócitos marginalizados. Aumento de 387X, HE.

5. Discussão

Produtos naturais têm sido utilizados desde tempos remotos com a finalidade de promover a cicatrização de lesões de forma mais rápida e com menor contaminação (CÉSAR, 1998). Ervas medicinais e produtos naturais são amplamente empregados como recursos terapêuticos alternativos no auxílio à cicatrização de lesões cutâneas (LOPEZ *et al.*, 1989). Produtos como óleo de fígado de Bacalhau (RAHAL *et al.*, 2000), óleo de Copaíba (EURIDES *et al.*, 1998) Aloe vera (CHITIRA *et al.*, 1998; TRACHTA E SILVA *et al.*, 2000), Própolis (LOPES *et al.*, 1989; SOMBOONWONG *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2000), açúcar (SEAL & MIDDLETON, 1991; MASTRANTONIO ET AL., 2002), Barbatimão (SHIMIZU, 2002) e baba de Escargot (CEZAR, 1998), dentre outros, são algumas substâncias com eficácia comprovada na aceleração do processo de reparo da pele.

Entre pescadores é costume espremer o olho do Mandi-amarelo, expelindo o humor vítreo, no ferimento causado pelo esporão do peixe, a fim de aliviar a dor lacinante e favorecer a cicatrização (NOMURA, 1996). Neste estudo foi utilizado o humor vítreo de Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) em lesões cutâneas como substância alternativa para favorecer o processo de reparação tecidual.

O humor vítreo humano é composto por 116 diferentes proteínas solúveis (KOYAMA *et al.*, 2003) atuando como um reservatório de fatores de crescimento (BITO, 1977). Quando tecidos adjacentes ao humor vítreo, como a retina e o cristalino apresentam algum problema, o vítreo pode promover um suplemento de fatores de crescimento e também de açúcares como a glicose (GRIERSON *et al.*, 2000). Os fatores de crescimento são proteínas de baixo peso molecular e apresentam resíduos ácidos (MALE, 2003). Eles são capazes de afetar a locomoção, contractilidade e diferenciação celular, efeitos que são importantes na reparação tecidual (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

Os fatores de crescimento são proteínas altamente conservadas, apresentando, muitas vezes, homologia entre seus domínios protéicos. Ao analisar fatores de crescimento em banco de dados (BLAST, ncbi), pode ser confirmada a semelhança existente entre os diferentes seres, sendo que o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), por exemplo, é uma proteína que apresenta homologia desde o *homo sapiens* a vírus, tal como, o *Bovine papular stomatitis virus*.

Dentre as 116 proteínas solúveis presentes no humor vítreo humano 7 são fatores de crescimento que atuam na regulação da reparação tecidual (KOYAMA et al., 2003) e apresentam o perfil de migração muito próximo de proteínas do humor vítreo do Mandi-amarelo (dados não publicados). Substâncias como fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) descritos no humor vítreo humano (KOYAMA et al, 2003) podem estar presentes em humor vítreo do Mandi amarelo.

O IGF quando administrado em conjunto com Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) ou FGF atua como potencializador da proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e epitelização. O EGF, mitógeno para uma variedade de células epiteliais e fibroblastos "*in vitro*", e causa divisão de células hepáticas "*in vivo*". O VEGF é um dos mais específicos reguladores da angiogênese, atuando na proliferação celular, permeabilidade e sobrevivência. O VEGF é mitógeno para células endoteliais vasculares derivadas de artérias, veias e linfáticos (CONN et al., 1990, FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997, FERRARA & HENZEL, 1989 e PLOUET et al., 1989). O VEGF é o único fator angiogênico potente que estimula a formação de capilares *in vivo* e tem ações mitogênicas diretas que são restritas à células endoteliais (PLOUET et al., 1989 e LEUNG et al., 1989). O FGF é mitogênico para a maioria das células do mesoderma e

neuroectoderma e apresenta como funções, promover a angiogênese, atuar no reparo tecidual através da migração de macrófagos, fibroblastos e células epiteliais para dentro do tecido danificado, e migração das células da epiderme para cobrir a lesão (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

No presente estudo, a análise macroscópica qualitativa dos animais tratados demonstrou que esses apresentaram um melhor aspecto na cicatrização das lesões em comparação aos animais não tratados até às 96 horas (4 dias) depois do procedimento cirúrgico. Fatores de crescimento, como IGF, FGF e EGF, presentes no humor vítreo podem ter contribuído com o reparo tecidual mais organizado observado no grupo experimental, bem como na redução significativa da lesão observada nos períodos de 2 e 5 dias.

O caráter gelatinoso do humor vítreo, devido à presença do ácido hialurônico, também pode ter agido como barreira física natural, protegendo a lesão do contato com agentes estranhos que poderiam dificultar o reparo tecidual. Outros componentes do humor vítreo poderiam favorecer o reparo, como o ascorbato que é capaz de promover proteção contra raio-X e luz UV e metabólitos como glicose são nutrientes importantes utilizados na produção de energia (DURCHSCHLAG, et al., 1999).

A contração e a epitelização são considerado os dois eventos fundamentais na cicatrização por 2ª intenção (CRUVINEL, 2000). Estes eventos são promovidos, principalmente, por fatores de crescimento que apresentam propriedade mitogênica, proliferativa e de epitelização (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística significativa na quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos nos períodos analisados, o valor de p em 2 dias foi muito próximos do nível de significância. Este fato sugere que provavelmente seria observada diferença se fosse utilizada uma amostra maior. Este possível aumento da quantidade de

vasos no grupo experimental pode ser resultado da ação de fatores de crescimento presentes no humor vítreo como VEGF.

Assim, o humor vítreo do Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) parece ser um potencial agente cicatrizante na reparação de pele, podendo ser um importante recurso terapêutico no tratamento de lesões ou outros processos patológicos relacionados à imunofisiologia cutânea. Agentes terapêuticos capazes de acelerar o processo de cicatrização podem ter grandes aplicações no tratamento de lesões cutâneas cirúrgicas, como no caso de cirurgia plástica, uma vez que há um grande interesse na rápida recuperação do tecido com a finalidade de obter-se uma menor cicatriz (CARDOSO, 2003).

6. Conclusão

A utilização do humor vítreo do Mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) em lesões cutâneas de *Ratus norvegicus* acelerou o processo de cicatrização, promovendo um melhor aspecto na reparação tecidual.

7. Referências Bibliográficas

1. BERGERON, J. A., WYNN, S. G. **Herbs i veterinary medicine**. [On Line]., p. 1-3. 1996, Disponível em: [http:// www. Altvetmed.com/](http://www.Altvetmed.com/).
2. BEVILACQUA, R. G., MODOLIN, M., SOARES, L. A. O processo de cicatrização: aspectos nutricionais e técnicos In : DIAS, G. E. **Patologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 1988. p.139-146.
3. BITO, L. Z. The physiology and pathophysiology of intraocular fluids. **Experimental eye research**. V.25, p.273-289, 1977.
4. BLISTEIN-WILLINGER, E. The role of growth factors in wound healing. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 175-82, 1991.
5. BOGLIOLO, L.; FILHO, G. B.; PITTELLA, J. E. H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E. A.; BARBOSA, A.J. A.; **Patologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 1243 p.
6. CARDOSO, C. R. B. **Influência da administração tópica dos ácidos graxos essenciais ω -3, ω -6 e do não essencial ω -9 na cicatrização de lesões cutâneas induzidas cirurgicamente**. 2003, 96 f., Dissertação de mestrado e Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Universidade Federal de Uberlândia, 2003.
7. CÉSAR, H. A. R. **Avaliação Macroscópica e Microscópica de Lesões Cutâneas de Ratos Tratados com Solução a Base de Muco (“baba”) de Escargot (*helix aspersa maxima*) Liofilizado**. Uberlândia : UFU/Instituto de Ciências biomédicas, 1998. 55p. (Monografia em Fisiologia, Graduação).
8. CHITIRA, P., SAJITHLAL, G.B., CHADRAHASAN, G. Influence of Aloe vera on the collagen characteristics in healing dermal wonds in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 181, p.71-76. 1998.

9. COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia Ilustrado e peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.:il, color.
10. CONCEIÇÃO, L.G., LOUES, F.L., CIEMENTE, J.T., FABRIS, V.E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia – revisão – parte 1. **Clínica Veterinária**, v.9, n.51, p.36-44, 2004.
11. CONN, G., BAYNE, M.L., SODERMAN, D.D., KWOK, P.W., SULLIVAN, K.A. PALISI, T.M., HOPE, D.A., THOMAS, K.A. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet derived growth factor. **Proceedings of the Indian National Science Academy**. U. S. A.V.87, P.2628–2632.1990.
12. CONTRAN, R. S. Et al. In: ROBBINS: **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1996. 1277p.
13. CONTRAN, R. S.; KURMAR, V.; COLLINS, T. Tissue repair: cellular growth, fibrosis, and wound healing. In: CONTRAN, R. S.; KURMAR, V.; COLLINS, T. (ed.). **Pathologic basis of disease**. 6th. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 89-112.
14. CRUVINEL, S. S. **Efeito da sulfadiazina de prata em lesões cirúrgicas experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos BALB/c. Aspectos morfológicos, microbiológicos, imunológicos e hematológicos**. 2000, 87 f., Dissertação de mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Universidade Federal de Uberlândia, 2000.
15. DAVIS, B.J. Disk eletroforesis II, method and application to serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404, 1964.

16. DURCHSCHLAG, H., FOCHER, C., ABRAHAM K., KULAWIK, B. Radiation effects on eyes components. **Radiation Physics and Chemistry**. V.55, p.691-697, 1999.
17. EBLING, F. J. G. COMPARATIVE DERMATOLOGY. Anatomy and organization of human skin. Functions of the skin. In: CHAMPION, R. H.; BURTON, J. L. AND EBLING, F. J. G. (ed.). **Textbook of dermatology**. 5th ed. Oxford: Blackwell, 1992. P. 17-155.
18. EURIDES, D. et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de lesões cutâneas de camundongos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 103, p. 123-126, maio/jun. 1998.
19. FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine reviews**. v.18, p.4-25. 1997.
20. FERRARA, N., HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 161, p.851-858. 1989.
21. GOMIERO, L. M. **Aspectos da biologia e da pesca experimental no reservatório de Volta Grande, Rio Grande (MG-SP)**. Rio Claro : UNESP/Instituto de Biociências, 1996. 96p. (Monografia, Graduação).
22. GRIERSON, I. HEATHCOTE, L., HISCOTT, P., HOGG, P., BRIGGS, M., HAGAN, S. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor in the eye. **Progress in Retinal and Eye Research**. v.19, n.6, p779-802, 2000.
23. HUNT, T. K. Wound healing. In: DUNPHY, J. E.; WAY, L. W. and associate authors (ed.) **Currente surgical diagnosis & treatment**. California: Lange, 1981. P. 93-105.

24. JIN, X., BOOKSTEIN, R., WILLS, K., AVANZINI, J., TSAI, V., LAFACE, D., TERRACINA, G., NIELSEN, B. SHI AND L.L. Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo. **Cancer gene therapy**. v.8, p. 982-989. 2001.
25. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. **Histologia Básica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p. P.359-370.
26. KOYAMA, R., NAKANISHI, T. IKEDA, T. SHIMIZU, A. Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors. **Journal of Chromatography B**. v.792, p.5-21, 2003.
27. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.
28. LEUNG, D.W., CACHIANES, G., KUANG, W.J., GOEDDEL, D.V., FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science** v. 246, p. 1306-1309. 1989.
29. LOPEZ, H.S., CAMBERROS, L.O., OCAMPO, A.A. Evaluación comparativa de la mezcla propoleo zabala com cicatrizantes comerciales. **Veterinária México**, v.20, n.4, p. 407-414, 1989.
30. LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M.; DESMOLIERE, A. Normal scarring: importance of myfibroblasts. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v.10. n.2, p. 86-92, 2002.
31. MALE, D. Migração celular e inflamação. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 6ª edição. São Paulo: Manole, 2003, 481 p.

32. MASTRANTONIO. E.C., EURIDES, D., BELETTI, M.E., SHIMIZU, B.J., MOTA. F.C.D., COELHO, C.C., CORTEZ. A.L.L., CAMPOS, W.A. Morfometria e histologia de lesões cutâneas de camundongos tratadas com própolis e calêndula (*Calendula officinalis*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, 2002.
33. Mc GEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N. A. **Oxford Textbook of Patology- Principles of Patology**. New York: Oxford Medical Publications, v-1, 1992, 792 p.
34. NOMURA, H. **Usos, crendices e lendas sobre peixes**. Mossoró: Fundação Vingt-Un Rosado/ETERN/UNED, 1996. 105p. (Coleção Mossoroense, Série "C", 882).
35. O'REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R., FOLKMAN J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**. v. 88, p. 277-285. 1997.
36. PANDYA, N. M., DHALLA, N. S., SANTANI, D.D. Angiogenesis—a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**. V.44, p.265-274. 2006.
37. PAPAVERO, N. (Org.). **Fundamentos Práticos de taxonomia zoológica**. São Paulo: UNESP/FAPESP, 1994. 285p.
38. PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do interstício. In: FILHO, G. B. (ed.) **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabar Koogan, 1999. P. 54-69.
39. PLOUET, J., SCHILLING, J., GOSPODAROWICZ, D. Isolation and Characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. **The EMBO journal**. v. 8, p.3801-3808. 1989.
40. RAHAL, S.H., BIAS, F., ROCHA, N.S., BRAZ, F., CORDEIRO, A. V., BOTERO, C.L. Estudo comparativo entre pomada orgânica cremosa e de nitrofurazona no

- tratamento de lesões, induzidas experimentalmente em cães. In: ANAIS DO IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA. 2000, Goiânia. **Anais...Goiânia** : Editora da Universidade Federal de Goiânia. 2000. v.1.
41. READON, A., HEINEGARD, D., MCLEOD, D., SHEEHAN, J.K., BISHOP, P.N. The Large Chondroitin Sulphate Proteoglycan Versican in Mammalian Vitreous. **Matrix Biology**. V.17, p.325-333, 1998.
42. REISFELD, R. A.; LEWIA, V. L.; WILLIAMS, D. E. Disk eletrophoreses of basic proteins and peptides in polyacrilamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.
43. SCHAFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **The British journal of surgery**, v.63, p. 237-240, 1996.
44. SEAL, D. V., MIDDLETON, K. Healing of cavity wounds with sugar. **The Lancet**, v. 338, p. 571-572, aug. 1991.
45. SHIMIZU, B.J. **Análise Fitoquímica do Barbatimão (*Stryphonodendron poliphyllum*) e sua utilização no tratamento tópico de lesões cutâneas de camundongos-estudo experimental**. 2002, 20 f., Dissertação mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia, 2002.
46. SILVA, E. B., BARBOSA SIVA, F., FRANCO, S. L., RAMALHO, L. T. O., PERUCHI, C. M. S. Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos. Estudo histológico. **Robrac**, v.9, n. 28, p.5-8, jan.2000.
47. SIQUEIRA JR, J. F., DANTAS, C.J.S. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.238.
48. SOMBOONWONG, J., THANAMITTRAMANE, JARYAPONGSKUL, A., PATUMRAJ, S. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation

- and wound healing in second degree burn model in rats. **Journal of Medical association of Taiwan**, v.83, n.4, p.417-425, 2000.
49. TEN CATE, A. R. Mucosa Bucal. **Histologia Bucal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 439p. P. 323-359.
50. TRACHTA e SILVA, E.A., STURION, D.J., TANAKA, N.M., HAENISCH, E.C., KISHINO, E.R., STURION, M.A.T. Uso de barbosa (Aloe vera) na cicatrização de pele em cães. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINARIA, 2000, Goiânia. **Anais...Goiânia** : Editora da Universidade Federal de Goiânia, 2000. v.1.
51. TROWBRIGDE, H. O. & EMILING, R. C. **Inflamação: uma revisão do processo**. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996. 172p.
52. XU, X.; RIVKIND, A.; PAPPO, O.; PIKARSKY, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of mast cells and myofibroblasts in human peritoneal adhesion formation. **Annals of surgery**. V.236, n.5, p. 593-601, 2002.

Sumário

1.	Introdução	1
1.1.	Histologia da Pele.....	1
1.2.	Cicatrização da Pele.....	4
1.3.	Produtos naturais utilizados para a cicatrização.....	9
1.4.	Mandi-amarelo (<i>Pimelodus maculatus</i> , lacepede, 1803, Pimeloidae)	12
2.	Objetivo	15
3.	Material e Métodos.....	16
3.1.	Obtenção de humor vítreo.....	16
3.2.	Animais Experimentais.....	16
3.3.	Análise Macroscópica da evolução das lesões.....	17
3.4.	Análise Histológica – Evolução microscópica da lesão	17
4.	Resultados	19
4.1.	Análise macroscópica da evolução das lesões	19
4.1.1.	Análise qualitativa	19
4.1.2.	Análise quantitativa	20
4.2.	Análise Histológica – Evolução microscópica da lesão	22
4.2.1.	Dois dias pós-operatório	22
4.2.2.	Cinco dias pós-operatório	22
4.2.3.	Sete dias pós-operatório.....	24
5.	Discussão	29
6.	Conclusão.....	33
7.	Referências Bibliográficas.....	34