

RODRIGO CARLOS NAHAS DE CASTRO PINTO

**Avaliação do efeito do cloridrato de papaverina na reparação de feridas
cirúrgicas abertas em dorso de ratos**

São Paulo

2010

RODRIGO CARLOS NAHAS DE CASTRO PINTO

**Avaliação do efeito do cloridrato de papaverina na reparação de feridas
cirúrgicas abertas em dorso de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

De Castro Pinto, Rodrigo Carlos Nahas

Avaliação do efeito do cloridrato de papaverina na reparação de feridas cirúrgicas abertas em dorso de ratos / Rodrigo Carlos Nahas De Castro Pinto; orientador Giuseppe Alexandre Romito. -- São Paulo, 2010.

78p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Neoplasias do tecido conjuntivo. 2. Alcalóides. 3. Ferimentos e lesões. 4. Cicatrização. 5. Tecido conjuntivo. 6. Epitélio. I. Romito, Giuseppe Alexandre. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

De Castro Pinto RCN. Avaliação do efeito do cloridrato de papaverina na reparação de feridas cirúrgicas abertas em dorso de ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus

Agradeço por este momento único, tão sonhado, tão esperado. Pela **Tua** presença espontânea em todos os instantes de minha vida, sem que eu precise pedir. Pelo auxílio em minhas decisões e conforto nas horas difíceis. Deu-me o dom da vida e me abençoou com a minha família e meus amigos. Agradeço a serenidade necessária para aceitar as coisas que não pude modificar. Coragem para modificar aquelas que eu pude e sabedoria para distinguir umas das outras. Agradeço por este instante preenchido completamente por **Sua** presença de amor. Dedico-te toda minha vida.

Aos meus Pais Luiz Carlos de Castro Pinto e Suely Nahas de Castro Pinto

Pelo amor incondicional e sem limites por mim e pelos meus irmãos, apesar das dificuldades. Pelos carinhos e simples abraços. Pelos seus sorrisos que nos iluminam e palavras doces que nos transmitem os mais simples, porém preciosos valores da vida. Obrigado por nos incentivarem a continuar buscando sempre nossos sonhos e em especial, por não me deixarem desistir nunca de percorrer o meu caminho e acreditarem sempre em mim.

Aos meus irmãos Julio Carlos N. C. Pinto, Luiz Carlos N. C. Pinto e Rita de Cássia N. C. Pinto

Por existirem em minha vida e mesmo distantes, por fazerem de forma tão próxima, parte dela. Obrigado pelo grande amor e preocupação. Por me apoiarem e estarem sempre presentes em meu coração. Agradeço sempre a Deus por fazer parte desta família.

À Micheli

“Um dia ousei sonhar um amor, nos seus braços senti paz, com a delicadeza dos teus toques me confortei, na imensidão do seu olhar me encorajei, no brilho do teu sorriso me apaixonei, e então, acordei desse sonho ao teu lado, e com o nosso amor me emocionei”. Minhas conquistas são tuas também, sem você nada teria sentido.

Às minhas cunhadas Giovana e Heidi e ao meu cunhado Gabriel

Por se tornarem parte de nossa família. Pelo carinho, ajuda e incentivo em momentos importantes da minha vida pessoal, profissional e acadêmica, desde o momento que os conheci. Muito obrigado.

Aos Meus queridos amigos Sérgio Kiyoshi Ishikiriama e Bela Luna Ishikiriama

Foi tua mão que encontrei quando precisei realmente de um amigo. Tuas palavras me orientaram a buscar o caminho correto. Agradeço tua força interior que, positivamente, muitas batalhas me ajudou a ganhar. Meu eterno obrigado.

Aos meus grandes e eternos amigos

...Acreditei em um bem maior e finalmente agradei a Deus.

E quando eu me dei conta, estava rodeado de amigos...

Minhas conquistas são de todos vocês. Muito Obrigado.

Aos meus queridos familiares da família Castro Pinto e Nahas

Pelo carinho, amor, atenção e disponibilidade em me ajudar sempre em vários momentos de minha vida. Muito obrigado.

In Memoriam

Ao Prof. Dr. Lotufo

Nunca esquecerei sua frase em minha primeira entrevista no **Mestrado**: “A idéia é boa e você tem potencial. Acredite, não desista, porque você tem futuro aqui na USP”. Meu eterno agradecimento.

Ao meu querido tio Deoclécio Nahas

Nunca esquecerei o tempo que passamos juntos. Eterno aprendizado de vida e profissional. Muito obrigado.

“O bem que você fizer hoje, poderá ser esquecido amanhã.”

“Faça o bem mesmo assim. Por que só assim, sua vida terá algum sentido.”

“Lembre-se, o futuro está em suas mãos.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, agradeço pela confiança depositada e por acreditar em meu potencial. Não tenho palavras suficientes para dizer, o tanto que tenho a te agradecer. Sua paciência, dedicação e sabedoria, incentivaram-me para a arte de pensar, vibrando com nossos acertos, me encorajando e orientando nas dificuldades. Conhecê-lo tem sido uma experiência de vida gratificante. Obrigado pela sua amizade e por me fazer acreditar ser sempre capaz.

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, nosso eterno responsável pela Disciplina de Periodontia da FOUSP, por sua sabedoria, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida. Por ter influenciado meus conhecimentos de forma tão profunda nas clínicas e seminários. Obrigado por acreditar em meu potencial.

Aos **Profs. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima e João Batista César Neto**, pela amizade, e colaboração em momentos decisivos para conclusão deste trabalho.

Aos **Professores Koto Nakae, Cesário Antonio Duarte, Luciana Saraiva, Giorgio de Micheli e Cláudio Mendes Pannuti**, pela amizade e confiança. Obrigado pelos ensinamentos durante o Estágio na Clínica da Graduação e sabedorias transmitidas durante o curso de Mestrado.

Ao **Prof. Jarbas Arruda Bauer**, por disponibilizar seu laboratório no departamento de biologia celular e do desenvolvimento (ICB/USP), seu conhecimento, durante a fase experimental deste trabalho. Obrigado por sua amizade e sabedoria.

Aos **Profs. Marco Antonio Paupério Georgetti e Victor Elias Arana-Chavez** pela disposição em contribuir com a elaboração deste trabalho durante a fase de qualificação. Obrigado pelas sugestões feitas no intuito de alcançarmos bons resultados.

Às **Profas. Suzana C. O. M. de Sousa e Luciana Corrêa**, pela participação direta na conclusão deste trabalho. Por disponibilizarem o laboratório de Patologia Geral/Bucal e seus conhecimentos durante a fase de confecção das lâminas e análise dos resultados. Sem a confiança e disposição em orientar, não seria possível concluir este trabalho e encontrar resultados tão bonitos e promissores.

Aos colegas de turma e eternos amigos, **Osmar Shizuo Okuda, Márcio Seto e Rodrigo Albuquerque Basílio dos Santos**, pela cumplicidade, amizade, constante ajuda, incentivo e colaboração durante os anos de estágio e de Mestrado. Por cada dia sem dormir para alcançarmos conhecimentos e por cada momento que estivemos juntos em busca de um único objetivo: superarmos nós mesmos para conquistarmos um sonho. Meu **Mestrado** também é de vocês. Muito obrigado.

A todos os colegas do curso de Mestrado ou Doutorado da Disciplina de Periodontia, por compartilharem suas sabedorias, experiências científicas e de vida: **Leandro Chambrone, Daniele Salami Lourenção, Flávia Sukekava, Silvia Linard Marcelino, Vanessa T. E. Alves, Sabrina Rosa Grande, Ecinele F. Rosa, Juliana C. Aun, Luciana A. Maltagliati, Isabela M. P. de Araújo Britto e Caroline G. Paixão**.

À **Mariana S. R. Zangrando**, pela amizade, cumplicidade e parceria em minha vida profissional e acadêmica. Muito obrigado.

À **Profa. Simone Tavares de Mendonça e ao Prof. Dr. Marcelo Garducci**, tudo começou mediante a ajuda de vocês. Muito obrigado pela confiança e amizade que a mim dedicaram.

Aos colegas que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho e compartilharam comigo suas amizades e os seus conhecimentos, **Fabio Luiz Mora Lima, Fábio Luiz Coracin e Amira Saad**. Meu eterno muito obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia: **Vera, Wilma** e, principalmente, **Márcia e Marília**, por toda a contribuição dispensada ao longo destes anos. Obrigado pela amizade, dedicação e por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Cirúrgica, ***Elisa dos Santos e Beatriz***, que sempre me receberam bem em seu local de trabalho, com paciência e com prontidão, proporcionaram a execução deste projeto.

Aos funcionários da biblioteca, pelo profissionalismo e atenção dispensados durante a fase final deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno de sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-las.

Os frágeis usam a força, os fortes, a inteligência.
Ninguém terá o prazer do estrelato se desprezar a beleza das coisas simples no anonimato.

Pois nelas se escondem os segredos da felicidade.
Seja um sonhador, faça de sua vida uma grande aventura.
Mas una seus sonhos com disciplina.
Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas, que nunca transformam seus sonhos em realidade.

Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados.
Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apóiam e nos compreendem.
Às vezes, somos obrigados a tomar decisões solitárias, tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês irão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar onde vocês estão.
Quem sonha não encontra estradas sem obstáculos, lucidez sem perturbações, alegrias sem aflição.

Mas quem sonha voa mais alto, caminha mais longe.
Sem sonhos, as pedras do caminho tornam-se montanhas, os pequenos problemas ficam insuperáveis, as pedras são insuportáveis, as decepções se transformam em golpes fatais e os desafios se transformam em fonte de medo.

O destino não é freqüentemente inevitável, mas uma questão de escolha.
Realizar sonhos implica riscos, riscos implicam escolhas, escolhas implicam erros.
Mas, quem faz escolhas, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.

Sonhe com as estrelas, para que você possa chegar ao menos à lua.
Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.
Acredite nos seus sonhos.

ADAPTADO DE AUGUSTO CURY

RESUMO

De Castro Pinto RCN. Avaliação do efeito do cloridrato de papaverina na reparação de feridas cirúrgicas abertas em dorso de ratos [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da aplicação subcutânea do cloridrato de papaverina no processo de reparação de feridas cirúrgicas abertas no dorso de ratos e avaliar pelos métodos histomorfológico, histomorfométrico e imunoistoquímico eventos biológicos do processo de reparação. Foram realizadas feridas dérmicas padronizadas com punch, 5mm de diâmetro e 2mm de profundidade, no dorso de ratos. Os animais foram divididos em dois grupos conforme o tratamento realizado: no grupo controle, 25 ratos foram tratados através da injeção de cloreto de sódio 0,9% e no grupo teste, 25 ratos foram tratados através da injeção da solução de cloridrato de papaverina a 50mg/mL de cloreto de sódio a 0,9%. Em ambos os grupos foi aplicado subcutâneo (por quadrante da ferida), 0,25mL da solução correspondente aos frascos do grupo teste ou grupo controle totalizando 1 mL da solução. Os 50 espécimes foram processados para as análises macro e microscópica. Para análise do cálculo do edema, foram utilizados 10 ratos (5 animais do grupo teste e 5 animais do grupo controle). Fragmentos de pele padronizados (3cm²) foram removidos da área da ferida e pesados no período de 6 horas. Para análise morfométrica do fechamento da ferida/formação de cicatriz, 10 ratos foram utilizados (5 animais do grupo teste e 5 do grupo controle). As feridas cirúrgicas padronizadas foram fotografadas nos períodos de 0h, 3,7,14 e 21 dias pós-cirúrgico e as imagens foram analisadas por software de morfometria (ImageLab2000[®]) quanto a área, perímetro e fator de forma. Pela técnica de coloração da hematoxilina e eosina, a análise histomorfológica (análise qualitativa descritiva) e histomorfométrica (análise quantitativa em relação à reepitelização, formação do tecido de granulação, edema, celularidade e matriz colagênica) foram realizadas nos períodos de 6h, 3,7,14 e 21 dias e analisadas sob microscopia de luz. Reações de imunoistoquímica com o anticorpo anti-actina de músculo liso foi realizada para identificação e contagem do número de miofibroblastos nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. A partir do modelo experimental avaliado, comprovou-se a

ação vasodilatadora da papaverina. Os fragmentos padronizados do grupo teste apresentaram maior peso em relação ao grupo controle ($p= 0,047$). As feridas do grupo teste mostraram um fechamento maior e menor formação de cicatriz quando comparado ao grupo controle no período de 21 dias. No grupo teste, uma maior quantidade de edema ($p = 0,028$) e uma menor quantidade de matriz colagênica (colágeno) ($p = 0,028$) foram encontradas no período de 6 horas. Houve maior reepitelização no grupo teste no período de 7 dias e menor formação de tecido de granulação nos períodos de 14 e 21 dias para o mesmo grupo. No grupo controle, um maior número de miofibroblastos foi encontrado quando comparado ao grupo teste nos períodos de 14 e 21 dias ($p=0, 016$). Dentro dos limites deste estudo, a aplicação subcutânea do cloridrato de papaverina parece acelerar o processo de reparação de feridas cirúrgicas abertas no dorso de ratos. Sua aplicação promove vasodilatação e um maior exsudato inflamatório no início do processo de reparação. Tal efeito parece estar relacionado com a maior velocidade de reparação observada macro e microscopicamente.

Palavras-chave: Miofibroblastos. Papaverina. Cicatrização de feridas cutâneas. Tecido conjuntivo. Tecido de granulação. Epitélio.

ABSTRACT

De Castro Pinto RCN. Effect of papaverine hydrochloride in open surgical repair of wounds in rats [Dissertation]. São Paulo:Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The objectives of this study were to evaluate the effect of subcutaneous administration of papaverine hydrochloride in the process of open surgical repair of wounds in the back of rats and evaluate the methods histomorphological, immunohistochemical and histomorphometric biological events of the repair process. Standardized wounds were inflicted by dermal punch, 5mm in diameter and 2mm deep, in the backs of rats. Animals were divided into two groups according to treatment: control group, 25 rats were treated by injection of sodium chloride 0.9% and test group (25 rats treated by the injection of papaverine hydrochloride 50 mg / mL sodium chloride 0.9%). In both groups was administered subcutaneously (by quadrant of the wound), 0.25 mL of the solution corresponding to bottles of the test group or control group, totaling 1 mL of the solution. The 50 specimens were processed for macro and microscopic analysis. For analysis of the calculation of edema, we used 10 rats (5 animals in the test group and 5 control animals). Standardized skin fragments (3cm²) were removed from the wound area and heavy during the 6 hours. For morphometric analysis of the closure of the wound / scar formation, 10 rats were used (five animals in the test group and 5 in the control group). Surgical wounds were photographed in standardized periods of 0h, 3,7,14 and 21 days after surgery and the images were analyzed by morphometry software (ImageLab2000 ®) as area, perimeter and form factor. By staining with hematoxylin and eosin, the histomorphologic analysis (descriptive qualitative analysis) and histomorphometric (quantitative analysis in relation to reepithelialization, formation of granulation tissue, edema, cellularity and collagen matrix) were recorded at 6h, 3.7 , 14 and 21 days and analyzed under light microscopy. Immunohistochemical reactions with anti-smooth muscle actin was performed to identify and count the number of myofibroblasts at 3, 7, 14 and 21 days. From the experimental model evaluated, proved the vasodilator papaverine. The fragments of the standardized test

group had a higher weight in the control group ($p = 0.047$). The wounds of the test group showed a greater closing and less scarring compared to control group within 21 days. In the test group, a greater amount of edema ($p = 0.028$) and a smaller amount of collagen matrix (collagen) ($p = 0.028$) were found within 6 h. A greater re-epithelialization in the test group after 7 days and less formation of granulation tissue during periods of 14 and 21 days for the same group. In the control group, a greater number of myofibroblasts was found when compared to the test group during the periods of 14 and 21 days ($p = 0, 016$). Within the limits of this study, subcutaneous administration of papaverine hydrochloride appears to accelerate the repair of surgical wounds opened in the back of rats. Its application promotes vasodilation and a greater inflammatory exudate in the early repair process. This effect appears to be related to a faster repair observed macroscopically and microscopically.

Keywords: Myofibroblasts. Papaverine. Cutaneous wound healing. Tissue. Granulation tissue. Epithelium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
AC	Adenilil-ciclase
AML	Actina de músculo liso
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico.
ATP	Adenosina trifosfato
CEEA	Comissão de Ética em experimentação Animal
C	Celularidade
EB	Espaço Branco
ED-A FN	Varição da fibronectina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FN	Fibronectina
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HØ	Hipótese de nulidade
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL-	Interleucina tipo 1
KGF	Fator de crescimento dos queratinócitos
MC	Matriz colagênica
PAP	Cloridrato de papaverina
PDE	Fosfodiesterase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetros
cm ²	Centímetro quadrado
µm	Micrometro
dpi	Dots per Inch = Pontos por Polegada
g	Gramma
h	Hora
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MHZ	Um milhão de Hert
mm	Milímetros
mm ²	Milímetro quadrado
N	Nilton
RPM	Rotação por minuto
X	Vezez
%	Porcentagem
+/-	Desvio Padrão
π	pi = 3,14...

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
6 RESULTADOS	43
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas cirúrgicas é altamente complexo e dependente da capacidade de reparação do tecido conjuntivo. Pode ser dividido em reação inflamatória, processo de proliferação celular com formação do tecido de granulação e remodelação tecidual (Schilling, 1976; Eming et al., 2007; Li et al., 2007; Toriseva; Kahari, 2009). A reação inflamatória envolve resposta vascular, através do processo de hemostasia e eventos celulares, incluindo infiltrado leucocitário com funções variadas de liberação de citocinas e antimicrobianos (Li et al., 2007). Durante o processo de proliferação celular, ocorre formação do epitélio para recobrir a superfície da ferida e, concomitantemente, formação do tecido de granulação (Kiritsy; Lynch, 1993). Essa formação envolve proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno, de matriz extracelular e neoformação vascular (Eming et al., 2007). Uma vez que o novo tecido sob a ferida é formado, a fase de remodelação tecidual inicia-se para restaurar a integridade da estrutura tecidual e sua competência funcional (Broughton et al., 2006).

Quando a ferida é de extensão limitada, com formação de um coágulo fino entre suas margens, sem haver contaminação e perda de tecido epitelial, a cicatrização é relativamente rápida e, portanto, chamamos de cicatrização por primeira intenção. Quando a massa tecidual removida pelo ferimento é de maior extensão, os processos inflamatórios são mais intensos e a cicatrização do local da lesão faz-se por segunda intenção (Mawaki et al., 2007). Nestes casos, o processo de reparação ocorre mediante uma contração tecidual (Tomasek et al., 2002).

A contração da ferida cirúrgica é um fenômeno altamente sincronizado que demanda interações harmônicas de vários elementos celulares e extracelulares que contribuem para o fechamento da ferida (Farahani; Kloth, 2008). Em resposta à perda tecidual, a hipótese mais aceita é que elementos celulares do tecido de granulação (fibroblastos e miofibroblastos) possam gerar forças contráteis no centro da ferida acarretando, portanto, uma aproximação das bordas através das conexões celulares e extracelulares (Baker et al., 1981; Farahani; Kloth, 2008). Os miofibroblastos são células diferenciadas com características semelhantes aos fibroblastos e células do músculo liso (Baker et al., 1981; Tomasek et al., 2002).

Acredita-se que sua atividade contrátil seja responsável pelo processo conhecido como contração da ferida. (Luomanen et al., 1988).

Alguns estudos mostraram, em modelo animal, a participação dos miofibroblastos no processo de reparação e contração da ferida (Tanaka et al., 2004; Beare et al., 2005; Mawaki et al., 2007). No entanto, nos casos onde ocorrem alterações dessas células, a contração tecidual pode ser prematura ou excessiva, aumentando o risco à formação de cicatriz e/ou fibrose (Tomasek et al., 2002; Ping et al., 2005; Farahani; Kloth, 2008), desfavorecendo a estética e limitando a função da região afetada.

É característico dos tecidos contendo miofibroblastos que a contração e/ou o relaxamento tecidual pode ser induzido através de agentes farmacológicos agonistas e antagonistas da atividade do músculo-liso (Majno et al., 1971; Madden et al., 1974). Existe evidência que alguns agentes vasodilatadores, como a papaverina, podem inibir a contratibilidade dos miofibroblastos em tecido capsular humano formado ao redor de implantes mamários (Baker et al., 1981). A papaverina é um inibidor não específico da fosfodiesterase, tendo como ação farmacológica o relaxamento da musculatura lisa, principalmente de arteríolas e capilares (Thomas, 2002). Devido seu efeito vasodilatador, a papaverina pode ser utilizada para a prevenção e tratamento dos espasmos dos enxertos arteriais em cirurgias cardiovasculares (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999; Vilandt et al., 1999), tratamento de disfunção erétil (Thomas, 2002), prevenção da contração dos enxertos de pele (Wang et al., 2004) e aceleração da expansão tecidual (Tang et al., 2004).

Assim, uma melhor compreensão do comportamento das principais células relacionadas com o processo de contração da ferida cirúrgica, os miofibroblastos, pode contribuir para que se consiga minimizar as seqüelas causadas pela atividade destas células (Tomasek et al., 2002) e descobrir formas de acelerar o processo de reparação tecidual (Wong et al., 1996; Farahani; Kloth, 2008). Neste contexto, pesquisar alguns efeitos biológicos da papaverina em feridas dérmicas pode acrescentar subsídios científicos importantes para o alcance destes objetivos, e assim, fundamentar seu possível uso clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Quando utilizamos uma estratégia de busca com combinação de vocabulário controlado e termos livres em texto, baseada na estratégia de pesquisa MEDLINE (via PubMed) para o descritor *papaverine*, encontramos cerca de 7221 referências relacionadas até julho de 2010. Nestes achados, a papaverina pôde ser utilizada para a prevenção e tratamento dos espasmos de enxertos arteriais em cirurgias cardiovasculares (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999; Vilandt et al., 1999), tratamento de disfunção erétil (Thomas, 2002) , prevenção da contração dos enxertos de pele (Wang et al., 2004) e aceleração da expansão tecidual (Tang et al., 2004). Quando combinamos os descritores *papaverine and wound healing*, as referências são escassas e se limitam ao número de 13 achados.

2.1 Miofibroblastos

A reparação de tecidos moles passa por uma complexa série de eventos inter-relacionados que envolvem propriedades físicas e mecânicas da ferida e dos tecidos periféricos durante sua transformação biológica, mas ainda são necessários muitos estudos e pesquisas para se esclarecer esses eventos, assim como a participação dos componentes celulares (Wong et al., 1996; Farahani; Kloth, 2008). Pode ser dividido em reação inflamatória, processo de proliferação celular com formação do tecido de granulação e remodelação tecidual (Schilling, 1976; Eming et al., 2007; Li et al., 2007; Toriseva; Kahari, 2009). Após a agressão, a vasoconstrição reduz a hemorragia e favorece a agregação plaquetária. A reação inflamatória envolve resposta vascular, que é caracterizada através da hemostasia e eventos celulares, incluindo infiltrado leucocitário com funções variadas de liberação de citocinas e antimicrobianos (Li et al., 2007). Os neutrófilos e macrófagos migram para a área da ferida para prevenir a invasão e proliferação de microorganismos (Broughton et al.,

2006). Durante o processo de proliferação celular, existe formação do epitélio para recobrir a superfície da ferida e, concomitantemente, formação do tecido de granulação para preencher o espaço perdido (Kiritsy; Lynch, 1993). Essa formação envolve proliferação de fibroblastos (que produzem componentes do tecido de granulação), deposição de colágeno, fibronectina (FN), matriz extracelular e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Uma vez que o novo tecido sob a ferida é formado, a fase de remodelação tecidual se inicia para restaurar a integridade da estrutura tecidual e sua competência funcional (Broughton et al., 2006; Li et al., 2007).

Quando a ferida é de extensão limitada, sem contaminação, com formação de um coágulo fino entre suas margens e não havendo grande perda de tecido epitelial, a reparação é relativamente rápida e chamamos de cicatrização por primeira intenção. Quando a massa tecidual removida pelo ferimento é de maior extensão, os processos inflamatórios são mais intensos e a cicatrização do local da lesão inicial faz-se por segunda intenção (Mawaki et al., 2007), aparecendo uma contração tecidual (Tomasek et al., 2002).

A contração da ferida é um fenômeno altamente sincronizado que demanda interações harmônicas de vários elementos celulares e extracelulares contribuindo para o fechamento da ferida que cicatriza por segunda intenção. No entanto, uma contração prematura ou excessiva resulta em formação de cicatriz (Ping et al., 2005; Farahani; Kloth, 2008).

A reepitelialização da ferida começa horas após a agressão e se inicia sobre a margem da derme residual e, subseqüentemente, sobre o tecido de granulação. Estimuladas pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento dos queratinócitos (KGF), as células epiteliais entram em processo de mitose, proliferação e migração celular para reconstituir a continuidade tecidual (Tomasek et al., 2002). Em resposta a perda tecidual, a hipótese mais aceita é que elementos celulares do tecido de granulação (fibroblastos e miofibroblastos) geram forças contráteis no centro da ferida, o que acarreta a um movimento das bordas em direção interna através das conexões celulares e extracelulares (Baker et al., 1981; Farahani; Kloth, 2008).

Após a reepitelização, ocorre uma diminuição importante no número de elementos celulares no tecido de granulação. Os miofibroblastos desaparecem através de apoptose e a contração da ferida diminui (Van Beurden et al., 2005).

Devido alguns fenômenos ainda não compreendidos, mesmo após a reepitelização, os miofibroblastos permanecem no local da lesão, a contração tecidual continua e a reparação não ocorre, levando a uma evolução do tecido de granulação para uma cicatriz hipertrófica. Esta se caracteriza pela presença de muitos miofibroblastos e uma inadequada produção da matriz extracelular, um processo chamado de fibrose, o que resulta na deformação do tecido conjuntivo (Tomasek et al., 2002).

A presença de cicatriz e/ou fibrose e da contração de feridas no tecido conjuntivo são desfavoráveis esteticamente e podem limitar a função da região afetada. Estes fenômenos parecem ser causados pela organização do tecido de granulação e pela alteração dos miofibroblastos (Tomasek et al., 2002).

Os miofibroblastos são células diferenciadas que possuem características de fibroblastos e células do músculo liso (Van Beurden et al., 2005). Morfologicamente, estas células possuem um aparelho contrátil composto por uma rede de microfilamentos arranjados paralelamente ao longo de seu eixo axial de 60 a 80 Å de diâmetro (Baker et al., 1981). Os microfilamentos por sua vez são compostos por actina, isoforma actina normalmente encontrada nas células musculares lisas, e outras proteínas associadas, como a miosina, semelhantes às fibras de estresse, sendo importantes na geração de força motriz e locomoção celular. Estes feixes de actina terminam na superfície dos miofibroblastos em fibronexus, um complexo de adesão especializado, que usam integrinas transmembranas para a ligação da actina intracelular com as fibrilas de fibronectina extracelulares (Tomasek et al., 2002). Este aparelho contrátil se caracteriza por gerar maior força, sendo que, sua atividade contrátil parece ser responsável pelo fechamento das feridas após as agressões (Luomanen et al., 1988). Esta geração de força mediada pelos miofibroblastos também foi encontrada em cultura de fibroblastos (Hinz; Gabbiani, 2003). Funcionalmente, esta atividade contrátil gera um sistema de transmissão mecânica de sinais, de modo que as forças que são geradas pelo estresse das fibras, podem ser transmitidas ao redor matriz extracelular. Por outro lado, sinais mecânicos extracelulares podem gerar uma resposta intracelular (Tomasek et al., 2002).

Outra característica dos miofibroblastos é que, semelhantes às células do músculo liso, estão ligados diretamente uns aos outros através de junções tipo GAP. As junções funcionais tipo GAP foram identificadas morfologicamente entre miofibroblastos em feridas dérmicas (Gabbiani et al., 1978), bem como entre

miofibroblastos, que são derivados de fibroblastos da córnea (Spanakis et al., 1998). Isso indica que miofibroblastos podem formar unidades contráteis multicelulares durante a contração do tecido de granulação (Tomasek et al., 2002).

É aceito que a modulação de fibroblastos para o fenótipo de miofibroblastos, com a aquisição de características contráteis especializadas, é essencial para a síntese da matriz extracelular e formação do tecido conjuntivo de remodelação durante a reparação de feridas normais ou patológicas (Hinz et al., 2007).

Alguns estudos avaliaram o comportamento dos miofibroblastos no processo de reparação e sua participação na contração da ferida cirúrgica utilizando modelo animal, através de incisão linear (Beare et al., 2005), circular (Tanaka et al., 2004) e quadrada (Mawaki et al., 2007). Estimulados por estresse mecânico e pelo fator de crescimento β transformador (TGF- β 1) produzido pelas células inflamatórias (Gabbiani, 2003), os fibroblastos se diferenciam num primeiro momento em proto-miofibroblastos e posteriormente em miofibroblastos. Os miofibroblastos aparecem precocemente no 4º dia ao longo das margens da ferida cirúrgica e no centro da ferida no 6º dia (Tanaka et al., 2004). De 7-11 dias observou-se uma distribuição de miofibroblastos em forma de “ponte” ligando as bordas da ferida. A contração dos miofibroblastos na estrutura em forma de “ponte” traciona as bordas da ferida para o centro. O aparecimento dos miofibroblastos no 4º ao 11º dia é muito importante para o processo de contração da ferida, sendo ele responsável pela redução de 20% do seu tamanho original (Mawaki et al., 2007).

Atualmente, os miofibroblastos podem ser classificados em dois tipos (Hinz; Gabbiani, 2003). O primeiro, os proto-miofibroblastos, são parcialmente diferenciados e contêm actina nas fibras de estresse não expressando α -actina de músculo liso. Este tipo de célula também expressa fibronectina intracelular. O segundo tipo, os miofibroblastos diferenciados, expressa α -actina de músculo liso e é caracterizado por possuir extensa rede de fibras contráteis, considerado assim, um miofibroblasto maduro (Tomasek et al., 2002; Hinz; Gabbiani, 2003).

A geração de tensão mecânica, devido à migração dos fibroblastos para o centro da ferida, promove a diferenciação das fibras de estresse que são características dos proto-miofibroblastos (Tomasek et al., 2002). Os fibroblastos exercem pequena força de tração na matriz recém formada, reforça o contato célula/matriz e desenvolve fibras de estresse contráteis e, conseqüentemente, se diferenciam em proto-miofibroblastos (Hinz; Gabbiani, 2003). O fator de crescimento

derivado de plaquetas (PDGF) é restrito na diferenciação de fibroblastos em proto-miofibroblastos, não sinalizando na expressão de α -actina de músculo liso (Van Beurden et al., 2005). No entanto, o PDGF parece ser importante na diferenciação dos queratinócitos em miofibroblastos (Jester et al., 2002). Portanto, o estresse mecânico é o fator mais importante na diferenciação dos fibroblastos em proto-miofibroblastos, ao passo que o PDGF, parece estar envolvido neste processo (Tomasek et al., 2002).

A tensão mecânica, o fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) e uma variação da fibronectina (ED-A FN) são sinalizadores importantes na diferenciação dos proto-miofibroblastos em miofibroblastos maduros (Gabbiani, 2003). O TGF- β 1 estimula a expressão de ED-A FN e α -actina de músculo liso, conseqüentemente, aumentando a diferenciação de fibras de estresse (Vaughan et al., 2000; Tomasek et al., 2002). A ED-A FN é uma variação específica da fibronectina, que inclui uma emenda de ED-A, que parece ser expressa na reparação de feridas (Tomasek et al., 2002). Mesmo na presença de TGF- β 1 e ED-A FN, os fenótipos de miofibroblastos desaparecem quando é removida a tensão mecânica (Hinz et al., 2001). Assim, a diferenciação de proto-miofibroblastos em miofibroblastos diferenciados é estimulada pela interação entre TGF- β 1 e ED-A FN na presença de tensão mecânica (Hinz et al., 2007).

A ferida cirúrgica é submetida a várias forças mecânicas que podem ser classificadas de acordo com sua origem. As forças extrínsecas ou exógenas são geradas nos tecidos profundos e superficiais localizados adjacentes a ferida e são transmitidos através de elementos de conexão, como as fibras extracelulares que estão entre o tecido normal e o ferido. As forças intrínsecas ou endógenas têm sua origem no centro da ferida (sinalizadas pelos tecidos adjacentes) e são mediadas por elementos passivos como a pressão do líquido intersticial e do exsudato inflamatório, e elementos ativos como o estresse contrátil intrínseco causado por interações célula-matriz (Silver et al., 2003). Após a deposição das fibras colágenas, tanto as forças mecânicas endógenas quanto às exógenas afetam o microambiente da ferida. Com a substituição gradual do tecido de granulação ocorre a diminuição da intensidade de força endógena da ferida e assim, ocorre uma tendência de distribuição paralela dos feixes de fibras colágenas em relação à superfície da pele. À medida que o processo de reparação da ferida avança, ocorre uma maior substituição do tecido de granulação e devido ao domínio resultante das forças

exógenas, a orientação das fibras de colágeno adquire um padrão mais uniforme e paralelo à superfície da pele (Farahani; Kloth, 2008).

É característico dos tecidos contendo miofibroblastos que a contração e/ou o relaxamento tecidual pode ser induzido através de agentes farmacológicos agonistas e antagonistas do músculo-liso (Majno et al., 1971; Madden et al., 1974). Existe evidência que alguns agentes vasodilatadores como a papaverina podem inibir a contratibilidade dos miofibroblastos em tecido capsular humano que se forma ao redor de implantes mamários (Baker et al., 1981). Dentre os relaxantes do músculo liso testados para minimizar a contração do tecido capsular, a papaverina foi o mais efetivo, sendo que o tecido capsular de 75% dos pacientes respondeu ao relaxamento (Baker et al., 1981). A razão pela qual ocorreu essa resposta à papaverina é provavelmente devido à presença dos miofibroblastos que possuem características de células musculares lisas (Rudolph et al., 1978).

A reparação de tecidos moles passa por uma série de eventos biológicos inter-relacionados que resultam na contração da ferida que cicatriza por segunda intenção. Ainda são necessários muitos estudos e pesquisas para se esclarecer o comportamento das principais células relacionadas a esse processo, os miofibroblastos e sua participação na formação do tecido contrátil (Tomasek et al., 2002), bem como descobrir formas de acelerar o processo de reparação tecidual (Wong et al., 1996; Farahani; Kloth, 2008).

2.2 Cloridrato de papaverina (PAP)

A papaverina é um alcalóide obtido a partir do suco leitoso proveniente da dessecação da papaver somniferum (papoula). Além da papaverina, quando este suco leitoso é pulverizado para se obter o pó de ópio, outros alcalóides são também obtidos, dos quais apenas a morfina, a codeína e a papaverina, têm aplicabilidade clínica. Esses alcalóides podem ser divididos em duas classes químicas distintas, os fenantrenos e as benzil-isoquinoleínas. Os principais fenantrenos são a morfina (que constitui 10% do ópio), a codeína (0,5%) e a tebaína (0,2%) e as principais benzil-isoquinoleínas são a papaverina (1%) e a noscapina (6%) (Rang et al., 2008).

A papaverina é um alcalóide encontrado no ópio, mas não intimamente

relacionado aos outros alcalóides na sua estrutura química e efeitos farmacológicos. É um relaxante de ação direta na musculatura lisa, usada no tratamento de impotência sexual e como vasodilatador, especialmente para o território cerebral (Morawski et al., 2003). Os mecanismos e efeitos farmacológicos não estão esclarecidos, mas, aparentemente, ela pode inibir a fosfodiesterase (Thomas, 2002) e ter efeitos diretos nos canais de cálcio (Gagnon et al., 1980). A papaverina como um agente vasodilatador pode ser utilizada para a prevenção e tratamento dos espasmos dos enxertos arteriais em cirurgias cardiovasculares (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999; Vilandt et al., 1999), tratamento de disfunção erétil (Thomas, 2002), prevenção da contração dos enxertos de pele (Wang et al., 2004) e aceleração da expansão tecidual (Tang et al., 2004).

Seu mecanismo de ação é pouco conhecido, mas parece envolver a combinação de inibição da fosfodiesterase (PDE) (Thomas, 2002) e o bloqueio dos canais de cálcio (Gagnon et al., 1980).

As fosfodiesterases são uma família de 14 isoenzimas geneticamente diferentes que hidrolizam nucleotídeos cíclicos e por isso tem um papel chave na regulação dos níveis intracelulares dos segundos mensageiros AMPc e GMPc, e portanto na função celular (Boswell Smith et al., 2006).

O AMPc é um nucleotídeo sintetizado no interior da célula a partir do ATP, pela ação de uma enzima ligada a membrana, a adenilil-ciclase (AC). Ele é produzido continuamente e inativado por hidrólise a 5'-AMP através da ação das fosfodiesterases. O AMPc regula muitos aspectos da função celular, incluindo, por exemplo, enzimas envolvidas no metabolismo celular, transporte de íons e as proteínas contráteis do músculo liso. Estes efeitos variados são, no entanto, todos efetuados por um mecanismo comum, ou seja, a ativação de proteínas quinases (PKA) pelo AMPc. As proteínas quinases (PKAs) regulam a função de muitas proteínas celulares diferentes pelo controle da fosforilação protéica. No músculo liso, a PKA dependente de AMPc fosforila e assim inativa outra enzima, a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK), que é necessária para a contração (Takeharu et al., 2005).

Assim, as drogas inibidoras de PDE (que são as enzimas que inativam o AMPc), como a papaverina, proporcionam um aumento dos níveis de AMPc intracelular, que por sua vez é capaz de ativar a proteína quinase (PKA) dependente

do AMPc, que fosforilando a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK) inibe, portanto, a contração muscular (Figura 2.1).

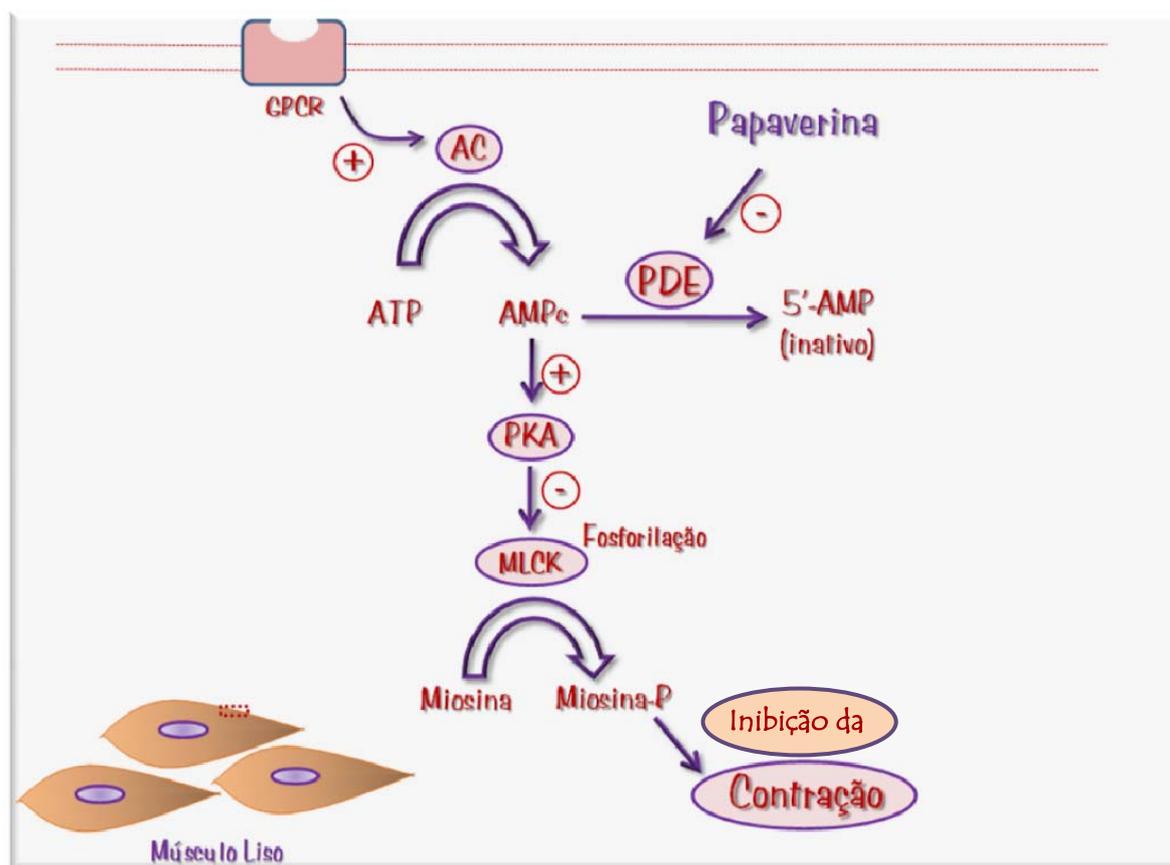


Figura 2.1 - Mecanismo de ação da papaverina na inibição da contração das células do músculo liso
 GPCR – Receptor acoplado à proteína G. AC – Adenilato ciclase. ATP - Adenosina trifosfato. AMPc – Adenosina monofosfato cíclico. PDE – Fosfodiesterase. PKA – Proteína quinase A. MLCK – Quinase de cadeia leve da miosina.

O relaxamento do músculo liso vascular, induzido através do uso de vasodilatadores como a papaverina, pode ser também resultado da diminuição da concentração de ativadores livres de cálcio intracelular. O mecanismo final desse relaxamento poderia ser ocasionado pela interferência da entrada de cálcio dentro das células e/ou aumento do seqüestro de cálcio em sítios intracelulares e/ou diminuição da mobilização de cálcio de organelas ou sítios intracelulares, e/ou efluxo de cálcio das células (Gagnon et al., 1980).

Preocupados com a contração dos enxertos arteriais, Uydes Dogan et al. (1996) ressaltaram que 40% das cirurgias de revascularização do miocárdio são

comprometidas pelo espasmo do enxerto, no trans e no pós-operatório, o que poderia aumentar o risco à morbidade e mortalidade do paciente. Ressaltou que o mecanismo exato de contração é desconhecido, mas tem-se atribuído à hipoxemia e injúria tecidual durante a coleta, isolamento e a preparação do enxerto. Desta maneira, a ação direta de vasodilatadores, como a papaverina, foi proposta para prevenção e tratamento do espasmo.

Chavanon et al. (1999), avaliaram o efeito tópico de vários vasodilatadores nos enxertos arteriais. Mediu-se o fluxo sanguíneo livre antes e 10 minutos após a aplicação tópica das soluções vasodilatadoras. O maior aumento do fluxo sanguíneo após aplicação ocorreu com papaverina. Concluíram que a aplicação tópica da papaverina no trans-operatório é mais eficiente para a redução do espasmo e no aumento do fluxo sanguíneo livre nos enxertos arteriais.

Com o intuito de verificar o metabolismo da papaverina em humanos, Kanto et al. (1979) avaliaram 10 pacientes saudáveis, de 22 a 43 anos de idade. Foi administrado em jejum, por via oral, 300 mg de papaverina. Os autores observaram que a concentração plasmática da papaverina não se manteve após 12 horas, demonstrando que a vida média plasmática da droga é curta.

Wilén e Ylitalo (1982) avaliaram o metabolismo do cloridrato de papaverina em humanos. Neste estudo foram selecionados 9 pacientes de 60 anos de idade que apresentavam funções do rim, fígado e gastrointestinais normais. Em jejum, foi administrado, por via oral, 200 mg de papaverina. Após a avaliação observaram que o pico de concentração plasmática da papaverina ocorreu 2 horas após a administração. De acordo com os autores, a excreção da papaverina e seus metabólitos ocorre em duas fases distintas: uma rápida eliminação nas primeiras 6-8 horas, seguida de uma eliminação mais lenta durante as 24 horas seguintes. Após 48 horas, a papaverina é quase totalmente absorvida pelo trato gastrointestinal e, portanto, rapidamente metabolizada.

Quando aplicada topicamente, a papaverina melhorou o padrão de contração tecidual dos enxertos de pele em animais (Wang et al., 2004). Neste estudo, os autores avaliaram a aplicação tópica do creme de papaverina em enxertos de pele em cinco mini porcos. Vinte feridas de espessura total foram criadas no dorso de cada animal. Enxertos padronizados (2cm² e 0.6mm de espessura) foram removidos longitudinalmente da linha média do abdômen dos animais e suturados sob cada ferida. As suturas foram removidas duas semanas

após a intervenção e os sítios enxertados foram divididos em dois grupos: grupo A (lado esquerdo do animal), recebeu aplicação do creme de papaverina a 2% duas vezes ao dia. Grupo B (lado direito do animal) recebeu a aplicação do creme placebo utilizando a mesma metodologia. Os enxertos foram medidos e monitorados mensalmente durante seis meses quando os animais foram sacrificados. Os fragmentos de pele foram observados em HE e analisados estatisticamente. Após a remoção da sutura, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os dados provenientes da análise em HE demonstraram que os enxertos do grupo A apresentavam menos fibroblastos, mais neoformação vascular e as fibras colágenas estavam seqüencialmente arranjadas com disposição paralela em relação à pele do animal. Os autores concluíram que a aplicação tópica do creme de papaverina pode inibir a contração dos enxertos de pele, sendo um método seguro, barato, com menor injúria, infecção e nenhum efeito adverso no leito enxertado.

A expansão tecidual é uma das mais importantes técnicas em cirurgia plástica reconstrutiva. Tang et al. (2004) avaliaram o uso tópico e sistêmico da papaverina no processo de expansão tecidual. Vinte e quatro mini porcos foram divididos em 3 grupos contendo 8 animais em cada. Quatro expansores de silicone foram implantados subcutâneos em cada animal do grupo A e C. Quatro expansores de silicone modificados, contendo uma cápsula externa com 100 furos, foram implantados subcutâneos no grupo B. Após 10 dias, os expansores foram inflados semanalmente com solução salina até chegar ao nível máximo de 150mL. Durante a inflação, o grupo A recebeu a aplicação tópica do creme de papaverina junto a superfície da pele expandida 2 vezes ao dia. No grupo B foi injetada semanalmente 2 mL de solução de papaverina(30mg/mL) dentro de cada cápsula exterior de cada expansor modificado. O grupo C foi considerado controle. Amostras de sangue foram colhidas e os fragmentos de pele dos tecidos expandidos foram medidos no término da inflação e analisados em HE. Diante da metodologia, a aplicação tópica e sistêmica de papaverina acelera o padrão de expansão tecidual, sendo o primeiro método mais efetivo. Os autores concluíram que a aplicação de papaverina é um método simples e efetivo e quando aplicada topicamente, o seu efeito pode persistir por até 12 horas.

Vasodilatadores tópicos são amplamente utilizados em microcirurgias reconstrutivas, a fim de minimizar o espasmo vascular trans-operatório (vasoespasma) e facilitar a anastomose microvascular. Um levantamento das

práticas atuais do departamento de cirurgia plástica do Reino Unido foi realizado por meio de questionários enviados, via e-mail, para 281 cirurgiões plásticos inscritos no país. Dos 84 cirurgiões que responderam ao questionário, 94% utilizam vasodilatadores durante as microcirurgias. Dentre os fármacos utilizados, a papaverina foi eleita pela maioria (52%), seguida dos bloqueadores dos canais de cálcio (47%) e anestésicos locais (27%). O motivo mais freqüente para o uso do vasodilatador foi empírico (42%), por hábito (21%) e porque funciona (16%). Os autores concluíram que vários vasodilatadores são rotineiramente utilizados em microcirurgias vasculares no Reino Unido, mas, há pouco embasamento científico para o seu uso (Yu et al., 2010).

Apesar do uso freqüente da papaverina em procedimentos cirúrgicos e reparativos, poucos são os trabalhos que avaliam os resultados da aplicação desta droga. Portanto, estudos são necessários para compreendermos os efeitos biológicos da papaverina, seus benefícios adicionais e, assim, fundamentar um possível uso clínico.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1- avaliar o efeito da aplicação subcutânea do cloridrato de papaverina no processo de reparação de feridas cirúrgicas abertas no dorso de ratos.

2- avaliar histo e imunoistoquimicamente alguns eventos biológicos do processo de reparação que podem estar relacionados com a aplicação subcutânea do cloridrato de papaverina em feridas cirúrgicas abertas no dorso de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da solução de cloridrato de papaverina (PAP)

A manipulação da solução de cloridrato de papaverina foi realizada por uma farmácia de manipulação independente, com concentração de 50mg de cloridrato de papaverina em 1mL de solução de cloreto de sódio 0,9% (Thomas, 2002). A manipulação da solução placebo foi realizada pela mesma farmácia de manipulação, possuindo as mesmas características de consistência e coloração comparada à solução PAP, não contendo o princípio ativo. Ambas as soluções foram distribuídas aleatoriamente em frascos A e B. A informação sobre o conteúdo dos frascos foi armazenada pela farmacêutica responsável e foi revelada via e-mail após a conclusão do experimento e coleta dos resultados. No frasco A continha a solução de cloridrato de papaverina (teste) e no frasco B continha a solução placebo (controle).

4.2 Amostra experimental

Este trabalho teve aprovação da comissão de ética em experimentação animal (CEEA) em 17/05/2007 sob o protocolo registrado nº 052 nas fls. 45 do livro 2 para o uso de animais em experimentação. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (Anexo A).

Foram utilizados 50 *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, adultos jovens, machos, com peso variável entre 300 e 350g, procedentes do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, os quais foram alimentados com ração comercial granulada para roedores (Labina, Purina) e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (teste e controle) e em 5 tempos experimentais (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Seleção dos grupos e tempo experimental.

Tempo	6 horas após a intervenção	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Grupo					
Teste	5	5	5	5	5
Controle	5	5	5	5	5

4.3 Procedimento cirúrgico

Todos os ratos foram submetidos à mesma intervenção cirúrgica, sob anestesia geral, por um único operador experiente. Após pesados, os ratos receberam injeção intra-peritoneal de cloridrato de xilidino dihidrotiazina (Rompum[®] - Bayer SA), na dose de 8,0 mg/kg de peso corporal. Após os sinais de sedação, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Dopalen[®] - Vetbrands) na dose de 100mg/kg de peso corporal aplicado via intra-peritoneal. Com uma lâmina de barbear foi realizada tricotomia de forma retangular no dorso dos animais envolvendo uma área de aproximadamente de 8cm de comprimento e 5cm de largura, na região lombar. Quando houve sinal de sangramento na pele do animal durante a tricotomia, o mesmo foi excluído do estudo. A anti-sepsia destas áreas foi realizada com solução de gluconato de clorexidina a 2%.

Para a realização do procedimento cirúrgico foi utilizado um motor com controle de torque e velocidade padronizada TD MAX (TechDrill[®]) durante a realização da ferida cirúrgica. Foi obtido de cada rato um fragmento de tecido mole com um “punch” estéril e previamente preparado. Este possuía 5mm de diâmetro e um sulco demarcador à 2mm de sua borda cortante, com o objetivo de padronizarmos o diâmetro e a profundidade das feridas durante o procedimento cirúrgico (Figura 4.1). Com um torque de 40N e uma velocidade constante de 500 rpm, o “punch” foi introduzido perpendicularmente em relação à pele do animal, até

atingir a face do músculo lastissimus dorsi, na 6ª vértebra lombar, na altura da crista ilíaca, com uma profundidade de aproximadamente 2 mm, produzindo a ferida cirúrgica (Figura 4.2). Cada fragmento foi removido com auxílio de uma pinça dente de rato e uma lâmina de bisturi 15 C. As medidas de cada incisão foram monitoradas com auxílio de uma régua milimetrada para medir a extensão (MAILLEFER, 186) e de uma sonda periodontal milimetrada (PCTUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, IL,USA) para o controle da profundidade. Após a realização do leito cirúrgico, a solução dos frascos do grupo teste ou controle foi aleatoriamente aplicada subcutâneo em cada rato com auxílio de uma seringa para insulina a uma profundidade de 2 mm medida através de um “stop” endodôntico (Figura 4.3). Em ambos os grupos foi aplicado subcutâneo (por quadrante da ferida), 0,25mL da solução correspondente aos frascos do grupo teste ou grupo controle totalizando 1 mL da solução. Em todos os grupos, a ferida cirúrgica foi protegida com uma gaze e micropore (3M®) que foi removida após 24 horas (Figura 4.4).

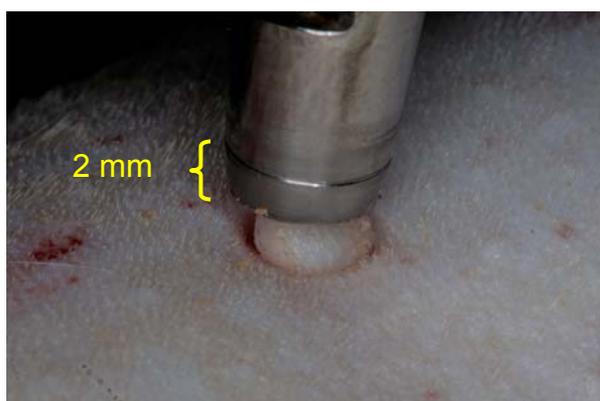


Figura 4.1 - Posicionamento do “Punch” (5mm de diâmetro e sulco demarcador 2 mm em relação a borda cortante do “punch”

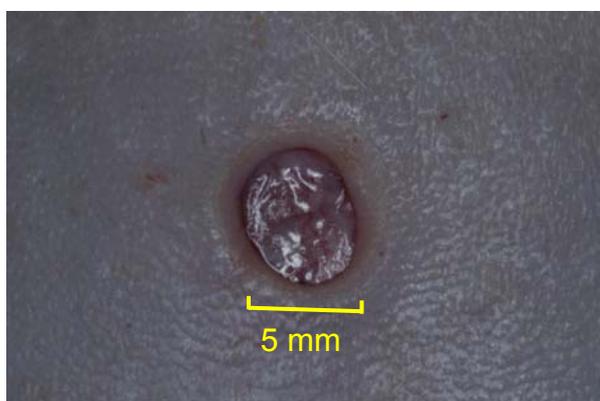


Figura 4.2 - Diâmetro da ferida cirúrgica (5 mm)



Figura 4.3 - Aplicação subcutânea das soluções (teste ou controle) a uma profundidade de 2 mm ("stop" endodôntico)



Figura 4.4 - Proteção da ferida com gaze e micropore (3M®)

4.4 Cuidados pós-operatórios

Após as intervenções, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração para roedores fragmentada e água *ad libitum*.

4.5 Avaliação pós-cirúrgica

Para a realização da remoção do fragmento de estudo, os animais foram sacrificados em grupo de 10 animais por dose letal de anestésico geral, de acordo com os seguintes intervalos de tempo: 6 horas após a cirurgia e 3, 7, 14 e 21 dias

após a intervenção. Após o sacrifício, seguindo os tempos indicados, as áreas em processo de reparação foram cirurgicamente removidas e fixadas em formalina a 10%.

4.6 Avaliação macroscópica

4.6.1 Avaliação do cálculo do edema

Foram utilizados 10 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), sendo 5 ratos correspondentes ao grupo teste e 5 ratos correspondentes ao grupo controle com o intuito de avaliar macroscopicamente o edema local (exudação plasmática) através do peso do fragmento no período de 6 horas após a intervenção cirúrgica. Para isso foram confeccionados guias cirúrgicos em silicone padronizados (3 cm²) (Figura 4.5). Os guias cirúrgicos foram perfurados no centro através do punch de 5mm de diâmetro para centralizá-lo ao máximo em relação a ferida cirúrgica (Figura 4.6). Em seguida, foi delimitada a área do fragmento a ser removida através de uma incisão linear (lâmina cirúrgica 15C) seguindo a forma do guia cirúrgico (Figura 4.7). Cada fragmento foi removido até face do músculo lastissimus dorsi com auxílio de uma pinça dente de rato e uma tesoura de ponta romba, de modo que houvesse uma maior remoção de toda camada de tecido conjuntivo, não se estendendo além da face muscular. Os fragmentos do grupo teste e do Grupo controle foram pesados com auxílio de uma balança analítica digital de precisão, com protetor de capela de vidro (Celtac[®]).

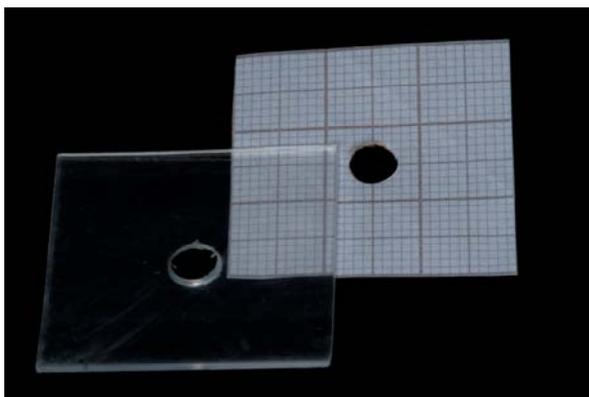


Figura 4.5 – Guia cirúrgico de silicone padronizado (3cm²)



Figura 4.6 – Guia cirúrgico posicionado ao centro da ferida



Figura 4.7 – Delimitação do fragmento utilizando lâmina de bisturi 15C

4.6.2 Análise morfométrica (fechamento da ferida/formação de cicatriz)

Foram utilizados 10 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), sendo 5 ratos correspondentes ao grupo teste e 5 ratos correspondentes ao grupo controle, com o intuito de avaliar macroscopicamente o processo de reparação e a formação das cicatrizes das feridas cirúrgicas. As amostras foram fotografadas nos seguintes intervalos de tempo: imediatamente após a intervenção (0h), 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento por meio de câmera digital (Rebel XTI Canon[®]) e objetiva de 100mm (EF macro Canon[®]) fixada em uma estativa, de forma a manter a padronização da distância focal. Cada animal foi anestesiado (mesmo protocolo descrito acima) em todos os intervalos de tempo para a realização das fotografias. Portanto, foi possível avaliar, no mesmo animal, o processo de reparação da ferida nos intervalos de tempo.

As imagens das feridas foram submetidas ao software Adobe® Photoshop® Elements 6.0, e transferidas para o software de morfometria digital (ImageLab 2000®) utilizando um computador Pentium® IV, 512 MHZ, monitor HP Pavillion®, 800X600 dpi. A avaliação foi realizada por um único observador cegado e treinado.

As feridas foram analisadas pelo software quanto ao valor do perímetro (Figura 4.8) e área (Figura 4.9), bem como a relação entre essas duas dimensões (fator de forma= $3\pi \times \text{área}/\text{perímetro}^2$). A mesma análise foi realizada nas 10 feridas nos intervalos de tempo indicados, sendo que a média das feridas em 0h foi utilizada como referência inicial.

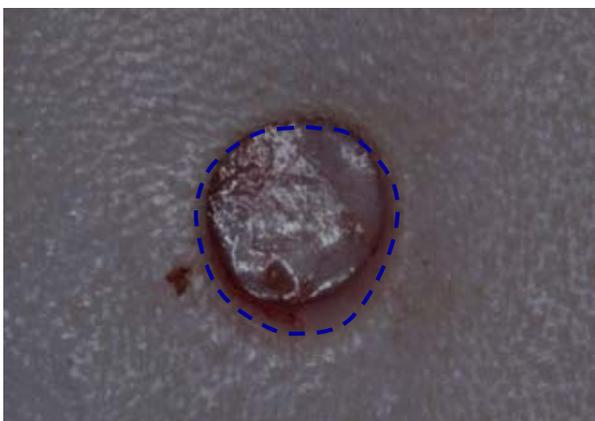


Figura 4.8 - Delimitação do perímetro da ferida cirúrgica no período de 0h

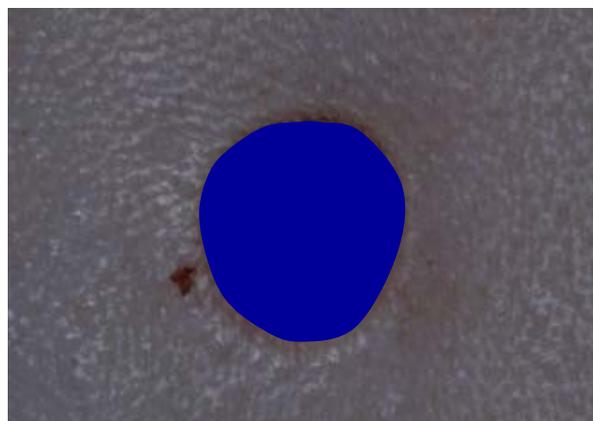


Figura 4.9 - Cálculo da área da ferida cirúrgica no período de 0h

Com essas medidas obtivemos dados quanto à homogeneidade do processo de fechamento da ferida/formação das cicatrizes nos diferentes intervalos de tempo. O fechamento da ferida e formação de cicatrizes foram consideradas mais regulares quanto mais próximos o valor do fator de forma estivesse do valor de referência 1, e irregular, quanto mais inferior ao mesmo, conforme padronização do software utilizado.

4.7 Processamento histológico

O processo laboratorial das amostras teciduais colhidas foi criteriosamente realizado por um único profissional treinado.

As amostras teciduais colhidas foram imediatamente submetidas ao processo de fixação em solução de formol a 10% por um período mínimo de 24 horas à temperatura ambiente. Este processo foi sucedido pela confecção do material em bloco de parafina, seguindo o protocolo composto por lavagem em água corrente por meia hora; desidratação em uma seqüência de álcool etílico em cadeia ascendente (70 % até álcool absoluto) por 5 minutos em cada álcool, diafanização em 2 banhos de xilol por 5 minutos em cada, banho em parafina fundida na estufa 58°C, onde permaneceram por pelo menos 24 horas à temperatura ambiente. Após a confecção dos blocos de parafina, foram realizados cortes semi-seriados perpendicularmente ao plano horizontal da peça, na região central da ferida cirúrgica, permitindo a obtenção de amostras do interior da ferida e dos tecidos circunvizinhos, usando-se um micrótomo de rotação (RM2045, Jung-Leica) calibrado para a espessura de 5µm. Posteriormente os cortes foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (HE) para a análise histomorfométrica.

4.8 Avaliação Microscópica

4.8.1 Análise histomorfológica

Os cortes corados em HE foram analisados em microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus optical Co. Ltd – Japan), com o aumento original final até 400x. Esta análise foi realizada por um único observador que não conhecia os grupos experimentais.

4.8.2 Análise histomorfométrica

A aplicação do método morfométrico neste trabalho foi utilizada com a finalidade de demonstrar, em base numérica, a evolução do processo de reparação nas feridas cirúrgicas tratadas com a solução teste (papaverina), quando comparadas às feridas cirúrgicas tratadas com a solução controle (placebo). Foi realizado a análise de histomorfometria digital baseado no protocolo descrito por Matos et al. (1994) e ratificado por outros autores (Fernandes et al., 2000; Rossum et al., 2007; Traina, 2008). À análise de histomorfometria foi realizada por um único observador treinado e cegado em relação às amostras.

Para o estudo de histomorfometria digital, as imagens das lâminas histológicas coradas em HE foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony[®]), acoplada a microscópio Joel[®] e placa de digitalização de imagens (Captivator[®]) e transferidas para software de morfometria digital (ImageLab 2000[®]), utilizando computador Pentium[®] IV, 512 MHZ, monitor Pavillion, 800X600 dpi.

As imagens do campo histológico (aumento original de 4X), na região da ferida cirúrgica, foram digitalizadas e analisadas quanto à área correspondente ao tecido de granulação (Figura 4.10) e reepitelização (distância margem a margem do epitélio remanescente da ferida cirúrgica) (Figura 4.11). Com essas medidas obtivemos dados quanto ao processo de formação/remodelamento do tecido granulação e reepitelização da ferida nos períodos de 3,7,14 e 21 dias após o procedimento.

Da mesma forma, as imagens do campo histológico (aumento original de 400X), na região da ferida cirúrgica, foram digitalizadas e analisadas (em porcentagem de pixels) quanto à celularidade (C), quantidade de elementos celulares presentes, tais como células inflamatórias e fibroblastos, medida pela presença da coloração da hematoxilina (roxa) indicativa de núcleos celulares, ao espaço branco sem coloração (EB), podendo ser interpretado como edema, luz dos vasos sanguíneos ou espaço entre fibras colágenas dentro da matriz organizada, e quanto às fibras colágenas e matriz colagênica (MC), medida pela porcentagem de tons róseos, representando a coloração pela eosina. Esses elementos teciduais forneceram uma estimativa da evolução do processo inflamatório/reparativo, em cada intervalo de tempo.

Para cada animal foram quantificados 8 campos consecutivos (elipse preta) que foram distribuídos próximos às margens da ferida, nos intervalos de 6 horas (4 campos em cada borda da ferida, sem envolver sua base)(Figura 5.2A), 3 dias (3 campos em cada borda da ferida e 2 campos em sua base) (Figura 5.3A) e nos períodos de 7 a 21 dias em toda a extensão da ferida, ou seja, de uma borda a outra (4 campos mais próximos à superfície e 4 campos mais profundamente (Figura 5.4C).

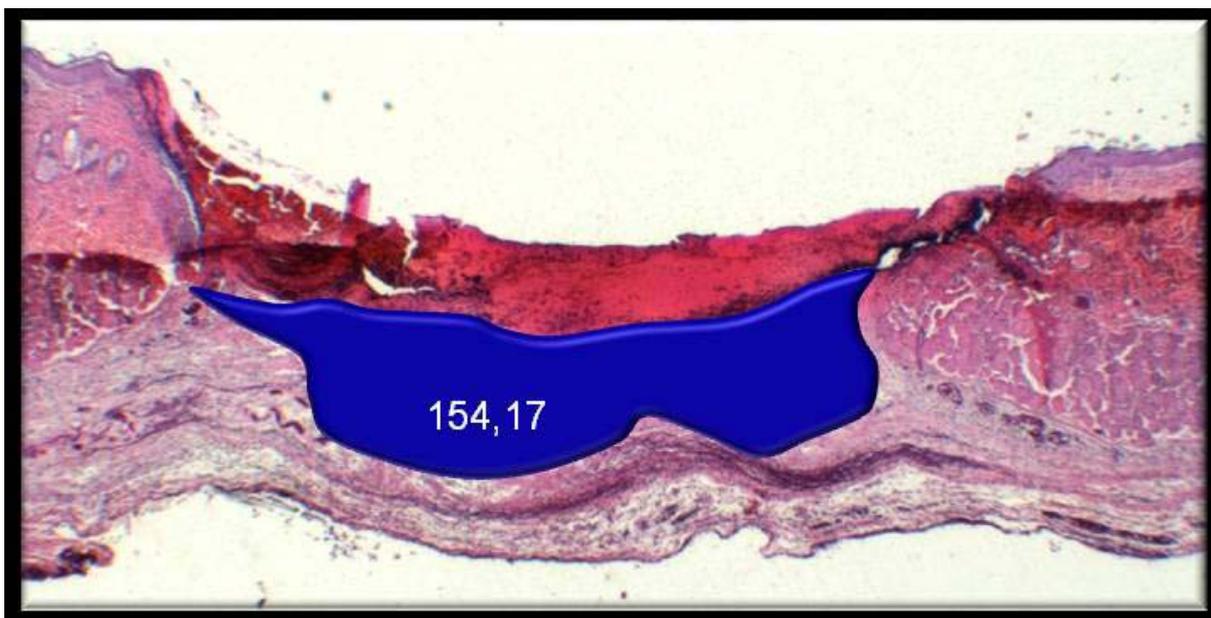


Figura 4.10 – Delimitação da área correspondente ao tecido de granulação nos cortes histológicos corados em HE no período de 3 dias

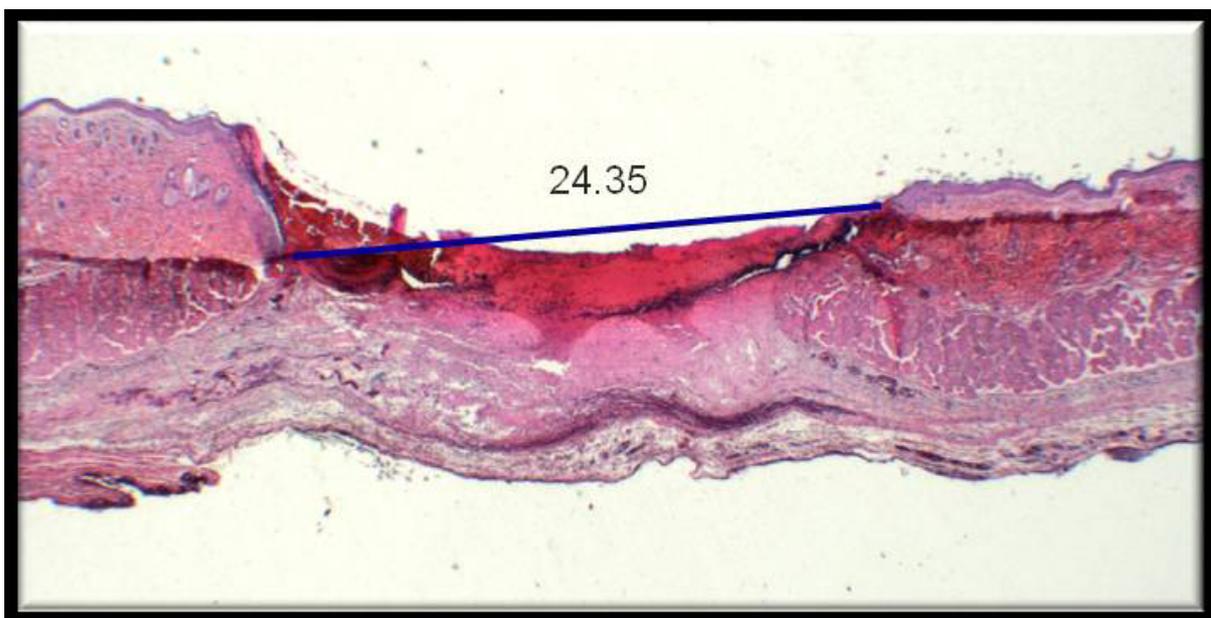


Figura 4.11 – Distância margem a margem correspondente à reepitelização cortes histológicos corados em HE no período de 3 dias

4.9 Reação imunoistoquímica

Para a realização das reações imunoistoquímicas, foi utilizado à técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos ao anticorpo anti-actina de músculo liso (Actin, alpha Smooth Muscle, 1A4, MxH da Dacocyto[®]).

4.9.1 Técnica de imunoistoquímica

Foram obtidos cortes de 3 μ m a partir dos espécimes emblocados em parafina e estendidos em lâmina de vidro previamente tratadas com solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10% em etanol absoluto.

Estes cortes foram desparafinados em 2 banhos de xilol, sendo que o primeiro banho foi por 15 minutos em estufa à temperatura de 60° C e o outro por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi realizado a reidratação dos cortes em série de etanol com concentrações descendentes (3 vezes em etanol absoluto, 95%, 85%) em banhos de 5 minutos cada.

Para remoção do pigmento formólico foi realizado um banho de 10 minutos em hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de água destilada.

Foi realizado o pré-tratamento para recuperação antigênica com solução de ácido cítrico 10nM, pH 6,0 consistindo de 3 banhos de 5 minutos em microondas, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de água destilada.

Os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de peróxido de hidrogênio 6% e metanol na proporção 1:1 em 2 banhos de 15 minutos cada. Posteriormente, foi realizado a lavagem em água corrente por 10 minutos, 2 banhos de água destilada e 2 banhos de 5 minutos cada em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) 0,5 M, pH7,4.

O anticorpo anti-AML foi diluído em solução tampão de TRIS, pH 7,6 acrescido de albumina a 1% em uma diluição de 1:200 e foram incubados sobre os cortes durante 30 minutos. Para incubação do anticorpo de ligação e do complexo

terciário foi utilizado o sistema kit LSAB+ (Dako Corp. Carpenteria[®], CA, USA) em incubações de 20 minutos cada.

As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (Dako Liquid DAB+ K3468, Dako Corp., Carpenteria[®], CA, USA) após incubação por 10 minutos e contra coloração com hematoxilina de Mayer. Todos os passos desde a utilização do anticorpo primário até a contracoloração foram realizados automaticamente com o equipamento Autostainer Dako Universal Staining System (Dako Corp, Carpenteria[®], CA, USA)

Como último passo antes da montagem das lâminas, os cortes foram desidratados em banhos de álcool em cadeia ascendente das concentrações.

4.9.2 Contagem de miofibroblastos nas fases da reparação tecidual

Os resultados para a marcação do anticorpo anti-AML foram analisados quantitativamente sendo a positividade considerada naquelas células que apresentaram coloração acastanhada na membrana celular, não sendo considerada a diferença de intensidade da cor.

Para análise quantitativa de miofibroblastos, foram realizados cortes histológicos de 3 μm das amostras de tecido das áreas incisadas e marcações de imunistoquímica. As áreas adjacentes às incisões foram captadas e digitalizadas através de um sistema de digitalização composto por microscópio de luz convencional Laboval 4 (Carl Zeiss, Alemanha) com câmera tipo CCD (Sony, Japão) conectada a placa digitalizadora Captivator[®] e acoplada ao computador HP Pentium III com software digital ImageLab 2000 (São Paulo) no aumento original de 400x (Bernacchio, 2007). As imagens captadas foram correspondentes ao tecido contíguo à área cirúrgica. Foram utilizados 10 campos de superfície (área de cada campo = 0,024 mm^2 , totalizando 0,24 mm^2). A contagem de miofibroblastos foi realizada pelo *software* ImageLab 2000, utilizando barra de ferramenta para contagem.

Os miofibroblastos foram contados por um único observador cegado e treinado. Foram considerados miofibroblastos as células com marcação positiva para a reação com anticorpo anti-AML (células coradas em marrom) e que não

apresentaram uma região central clara, que possivelmente representaria a luz de um vaso sanguíneo. Os vasos sanguíneos serviram de controle interno da reação, pois, também apresentam AML na estrutura do endotélio. Não é possível através da metodologia utilizada, diferenciar os vasos cortados longitudinalmente dos miofibroblastos, portanto, estes foram considerados células positivas.

5 RESULTADOS

5.1 Método estatístico

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, avaliando a homogeneidade dos dados. Foi estipulado o nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$) para a rejeição da hipótese de nulidade (H_0).

Os resultados foram analisados através do teste não paramétrico para amostras independentes (*Teste de Mann-Whitney*), com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre os grupos estudados (teste e controle), em cada momento de observação.

5.2 Avaliação macroscópica

5.2.1 Avaliação do cálculo do edema

Os resultados da análise do cálculo do edema estão representados na tabela 5.1. Foi verificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao peso do fragmento no período de 6 horas. O grupo teste apresentou maior peso dos fragmentos comparado com o grupo controle ($p = 0,047$).

Tabela 5.1 – Comparação dos dados da análise do cálculo do edema em relação ao peso do fragmento no período de 6 horas para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
PESO DO FRAGMENTO	Teste	5	2,8693	0,6024	2,2268	3,4383	2,2409	2,9884	3,4382	0,047*
	Controle	5	2,2014	0,1750	2,0410	2,4891	2,0756	2,1333	2,3613	
	Total	10	2,5353	0,5467	2,0410	3,4383	2,1275	2,2442	3,1008	

*Diferença estatisticamente significativa

5.2.2 Análise morfométrica (fechamento da ferida/formação de cicatriz)

Foi verificado que não existiu diferença estatisticamente significativa para o variável fator de forma em todos os intervalos de tempo estudados. Para as variáveis área e perímetro, não existiu diferença estatisticamente significativa nos intervalos de tempo de 0h, 3 e 14 dias. Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle com relação a essas variáveis nos intervalos de tempo de 7 e 21 dias (Tabela 5.2).

Devemos salientar que no período de 21 dias, toda amostra do grupo teste apresentava completa reepitelização da ferida cirúrgica observada clinicamente, não havendo a presença de crosta e restando apenas o formato de uma pequena cicatriz. No entanto, no grupo controle, no mesmo intervalo de tempo, apenas 2 animais apresentaram completa reepitelização observada clinicamente e 3 animais apresentavam crostas remanescentes e formação de cicatrizes maiores (Figuras 5.1 A, B, C, D, E, F, G, H, I).

Tabela 5.2 – Comparação dos dados da análise morfométrica (fechamento da ferida/formação de cicatriz) com relação ao valor da área, perímetro e fator de forma nos períodos de 0h, 3, 7, 14 e 21 dias para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

continua...

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
Área 0H	Teste	5	30,1682	0,9882	29,3919	31,8775	29,5151	29,8680	30,9714	0,251
	Controle	5	28,6998	3,1180	24,3990	33,0111	26,2105	28,2847	31,3966	
	Total	10	29,4340	2,3138	24,3990	33,0111	28,2190	29,7102	30,5184	
Perímetro 0H	Teste	5	20,7999	0,4321	20,4623	21,5542	20,5303	20,6854	21,1268	0,251
	Controle	5	20,4475	1,2381	18,6877	22,1696	19,4678	20,5391	21,3814	
	Total	10	20,6237	0,8938	18,6877	22,1696	20,4087	20,5958	20,9130	
Fator forma 0H	Teste	5	0,8762	0,0082	0,8622	0,8821	0,8697	0,8778	0,8820	0,347
	Controle	5	0,8516	0,0354	0,7945	0,8825	0,8193	0,8589	0,8803	
	Total	10	0,8639	0,0275	0,7945	0,8825	0,8552	0,8775	0,8819	
Área 3D	Teste	5	44,0250	10,4332	33,3634	55,8480	33,9494	42,8407	54,6929	0,754
	Controle	5	40,7357	5,2330	36,7050	49,3700	36,9715	38,4659	45,6349	
	Total	10	42,3804	7,9721	33,3634	55,8480	36,1626	40,1828	50,4120	
Perímetro 3D	Teste	5	25,3309	2,9184	22,5338	28,3754	22,5477	24,8418	28,3588	0,754
	Controle	5	24,3705	2,5987	20,6354	27,5292	21,8993	25,1269	26,4636	
	Total	10	24,8507	2,6539	20,6354	28,3754	22,5546	24,9844	27,7324	
Fator forma 3D	Teste	5	0,8520	0,0215	0,8257	0,8737	0,8307	0,8526	0,8731	0,117
	Controle	5	0,8196	0,0349	0,7656	0,8597	0,7910	0,8186	0,8487	
	Total	10	0,8358	0,0322	0,7656	0,8737	0,8180	0,8367	0,8629	
Área 7D	Teste	5	26,0737	8,6770	18,7896	40,5851	19,7976	23,1135	33,8301	0,016*
	Controle	5	61,1387	19,4050	30,8737	80,9930	42,8213	66,8197	76,6156	
	Total	10	43,6062	23,2886	18,7896	80,9930	22,5365	35,7294	68,1743	
Perímetro 7D	Teste	5	19,4888	3,1759	17,1765	24,8986	17,2562	18,4458	22,2430	0,016*
	Controle	5	29,5953	5,1031	21,2382	34,3956	25,0113	31,0413	33,4562	
	Total	10	24,5420	6,6655	17,1765	34,3956	18,1683	23,0684	31,4102	
Fator forma 7D	Teste	5	0,8467	0,0351	0,8003	0,8868	0,8115	0,8536	0,8784	0,602
	Controle	5	0,8562	0,0152	0,8307	0,8714	0,8446	0,8601	0,8659	
	Total	10	0,8514	0,0260	0,8003	0,8868	0,8287	0,8593	0,8704	
Área 14D	Teste	5	26,8779	8,2746	19,4184	38,9918	19,9285	24,0001	35,2662	0,917
	Controle	5	28,0392	14,1802	11,5601	48,6241	16,4716	23,7713	41,7408	
	Total	10	27,4585	10,9623	11,5601	48,6241	20,1836	23,8857	35,8911	
Perímetro 14D	Teste	5	21,3275	2,6987	18,0727	25,5094	19,3148	20,7783	23,6150	0,917
	Controle	5	20,7011	5,7243	13,2801	28,2646	15,3879	20,8497	25,9401	
	Total	10	21,0143	4,2319	13,2801	28,2646	17,9285	20,8140	24,0891	
Fator forma 14D	Teste	5	0,7316	0,0840	0,6078	0,8401	0,6590	0,7471	0,7966	0,251
	Controle	5	0,7878	0,0708	0,6872	0,8778	0,7261	0,7854	0,8508	
	Total	10	0,7597	0,0790	0,6078	0,8778	0,7045	0,7590	0,8278	

(conclusão)										
Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
Área 21D	Teste	5	13,0645	6,8402	3,5947	21,4310	7,4509	11,3095	19,5558	0,016*
	Controle	5	32,3466	15,1122	18,1942	56,7112	21,0118	26,7238	46,4929	
	Total	10	22,7056	15,0191	3,5947	56,7112	11,3089	19,8126	29,1115	
Perímetro 21D	Teste	5	16,2286	4,8117	8,4700	20,9384	12,0798	16,6989	20,1424	0,047*
	Controle	5	22,7402	4,1928	17,8072	28,9295	18,9852	23,1144	26,3082	
	Total	10	19,4844	5,4664	8,4700	28,9295	16,4466	19,7548	23,2575	
Fator forma 21D	Teste	5	0,5849	0,0466	0,5095	0,6297	0,5434	0,5936	0,6220	0,076
	Controle	5	0,7571	0,1361	0,5337	0,8532	0,6274	0,8260	0,8524	
	Total	10	0,6710	0,1320	0,5095	0,8532	0,5664	0,6220	0,8324	

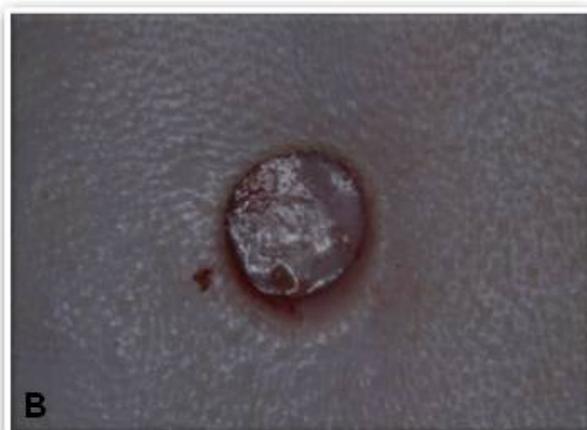
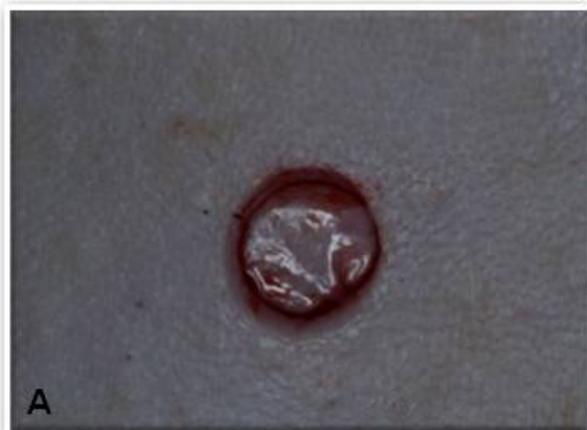
*Diferença estatisticamente significativa

GRUPO CONTROLE

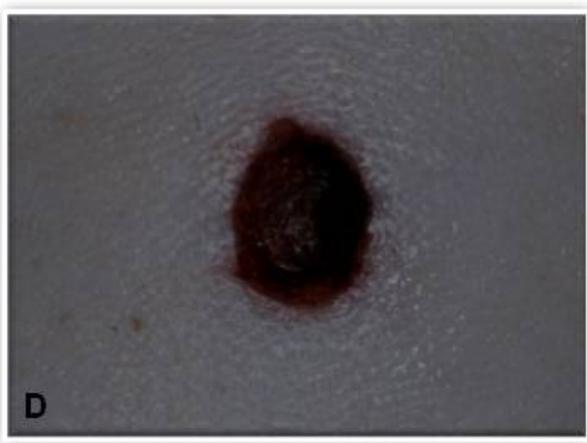
GRUPO TESTE

continua...

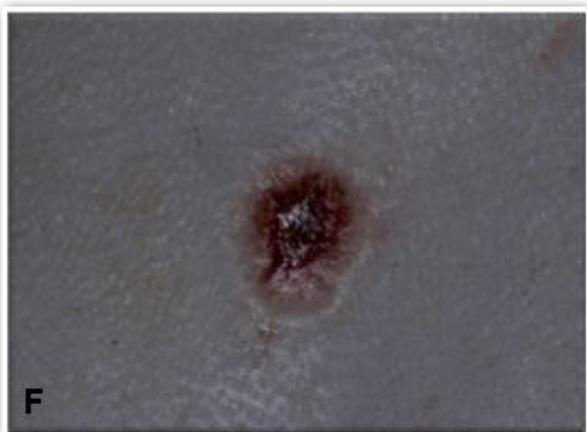
0 h



3 DIAS



7 DIAS



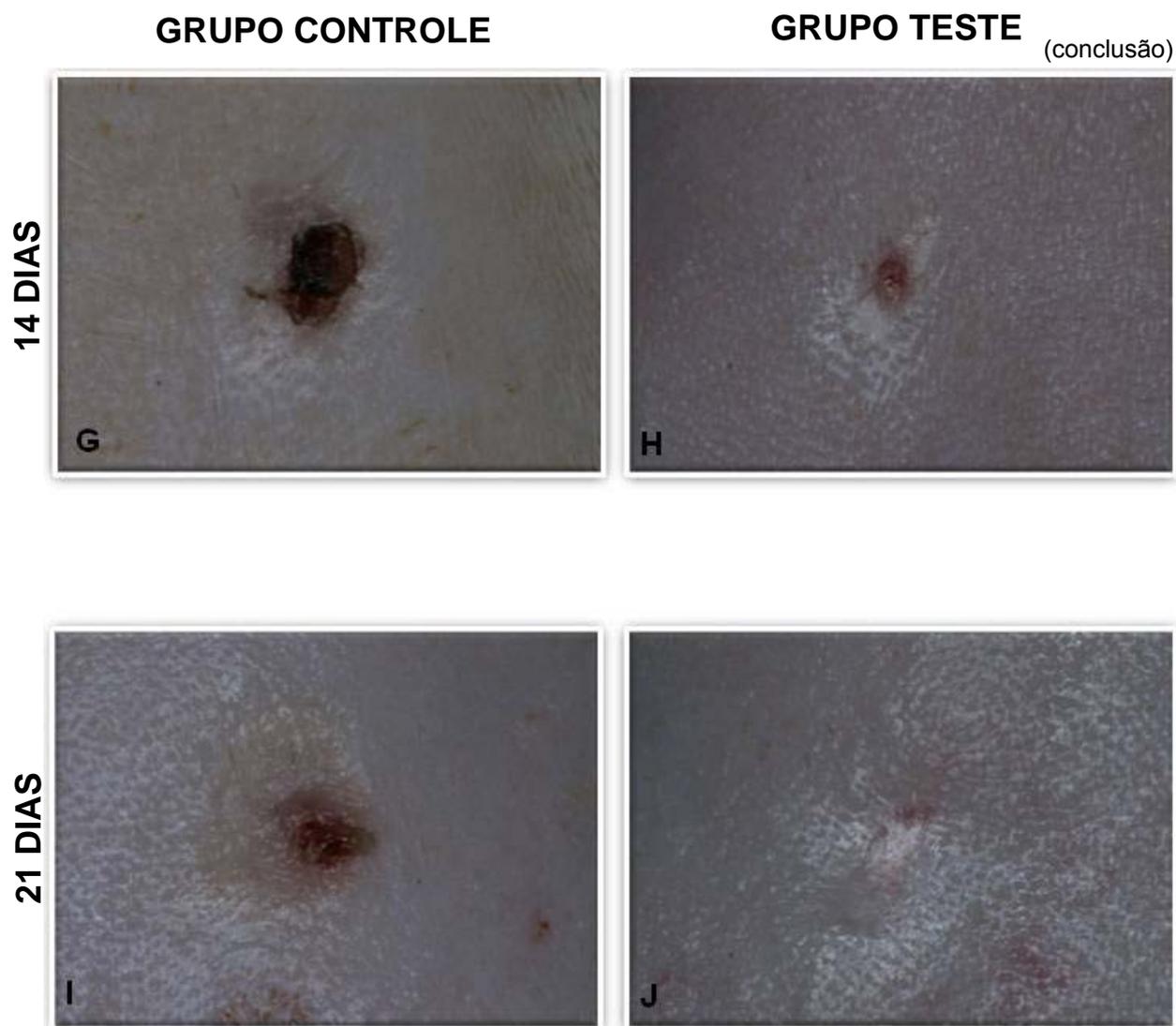


Figura 5.1 - Análise morfométrica (fechamento da ferida/formação de cicatriz). A Fotografia digital padronizada dos grupos controle e teste nos períodos de 0 h e 3, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico

5.3 Avaliação microscópica

5.3.1 Análise histomorfológica

Os dados da análise histomorfológica dos cortes corados em HE foram comparados entre os grupos com intuito de verificar possíveis diferenças entre os grupos estudados (teste e controle), em cada momento de observação, ou seja, nos períodos de 6 horas, 3, 7, 14 e 21 dias.

Os principais aspectos dos cortes histológicos analisados de forma qualitativa em microscópio de luz convencional estão ilustrados nas figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6 e descritos a seguir:

Período de 6 horas

- Grupo controle: observou-se fragmento de pele exibindo descontinuidade epidérmica e dérmica com bordas necróticas superficiais, infiltrado inflamatório neutrofílico leve e edema inflamatório moderado. O defeito se estende até a hipoderme apresentando fundo hemorrágico.
- Grupo teste: foram observadas as mesmas características encontradas nos cortes histológicos do grupo controle, porém, na hipoderme notou-se um intenso edema junto às fibras musculares e leve exsudação neutrofílica. Na derme e no tecido adiposo da hipoderme foi observado intensa hiperemia (indicativo de vasodilatação). Em 1 espécime foi identificado uma área focal de trombose acometendo pequeno número de vasos.

Período de 3 dias

- Grupo controle: observou-se fragmento de pele exibindo área de defeito, sem bordas necróticas e formação de “língua” epitelial (proliferação epitelial). Foi notado intenso infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear difuso, grande quantidade de fibrina, intensa hiperemia, exudação celular e intensa substituição do coágulo sanguíneo por tecido de granulação. Em 1 espécime foi identificado na base da ferida uma área focal de abscesso. Observou-se presença de “crosta” na superfície da ferida.
- Grupo teste: foram observadas as mesmas características encontradas nos cortes histológicos do grupo controle, porém, foram notadas áreas focais de hemorragia na base do defeito.

Período de 7 dias

- Grupo controle: observou-se fragmento de pele com intensa reepitelização, com camadas de queratinócitos, camada basal exibindo hiperchromatismo (indicativo de intensa proliferação de queratinócitos) e remanescentes da “crosta” na superfície da ferida. Na derme foi observado tecido de granulação exuberante, intensa neovascularização, infiltrado inflamatório moderado e grande quantidade de fibroblastos jovens. Na hipoderme, formação inicial das fibras musculares e discreto edema.
- Grupo teste: foram observadas as mesmas características encontradas nos cortes histológicos do grupo controle, porém, na derme foi notado tecido de granulação exuberante e uma grande quantidade de fibras colágenas, fibroblastos jovens e vasos sanguíneos neoformados. Foi observado na hipoderme, regeneração muscular avançada e discreto edema.

Período de 14 dias

- Grupo controle: observou-se fragmento de pele exibindo reepitelização praticamente completa, constatado por “ponte” epitelial com poucas camadas de queratinócitos e presença de discreta camada de queratina. Na derme foi notado tecido de granulação moderado, com substituição parcial dos feixes de fibras colágenas. Intensa hiperemia e vascularização foram observadas na derme e hipoderme. Foi observada reepitelização completa em 3 dos 5 espécimes avaliados.
- Grupo teste: observou-se fragmento de pele exibindo reepitelização completa em 4 dos 5 espécimes avaliados. Notou-se “ponte” epitelial composta por várias camadas de queratinócitos e camada de queratina discreta. Na derme foi identificado tecido de granulação parcialmente substituído por feixes de fibras colágenas as quais exibem uma tendência de distribuição paralela. Na hipoderme notou-se regeneração muscular completa e discreta angiogênese nas margens da ferida. Em alguns espécimes foi possível observar quase total substituição do tecido de granulação por feixes de fibras colágenas.

Período de 21 dias

- Grupo controle: observou-se fragmento de pele com reepitelização completa, com áreas hiperplásicas, epitélio delgado e moderada camada de queratina. Em 2 espécimes foram observados remanescente da “crosta” superficial. Na derme foi notado tecido de granulação moderado com grande quantidade de feixes de fibras colágenas distribuídas paralelamente entre si, poucos vasos sanguíneos e moderada quantidade de fibroblastos jovens. Na hipoderme foi observado fibras musculares em regeneração.
- Grupo teste: observou-se fragmento de pele exibindo reepitelização completa composto por epitélio queratinizado com espessura similar ao epitélio pré-existente. Na derme, notou-se na área do defeito grande quantidade de fibras

colágenas e fibroblastos com distribuição paralela, substituindo totalmente o tecido de granulação. Na hipoderme, observou-se a regeneração muscular avançada na base da ferida e completa nas margens. Nas margens da ferida foi observada formação inicial de anexos cutâneos (foliculo piloso e glândulas sebáceas).

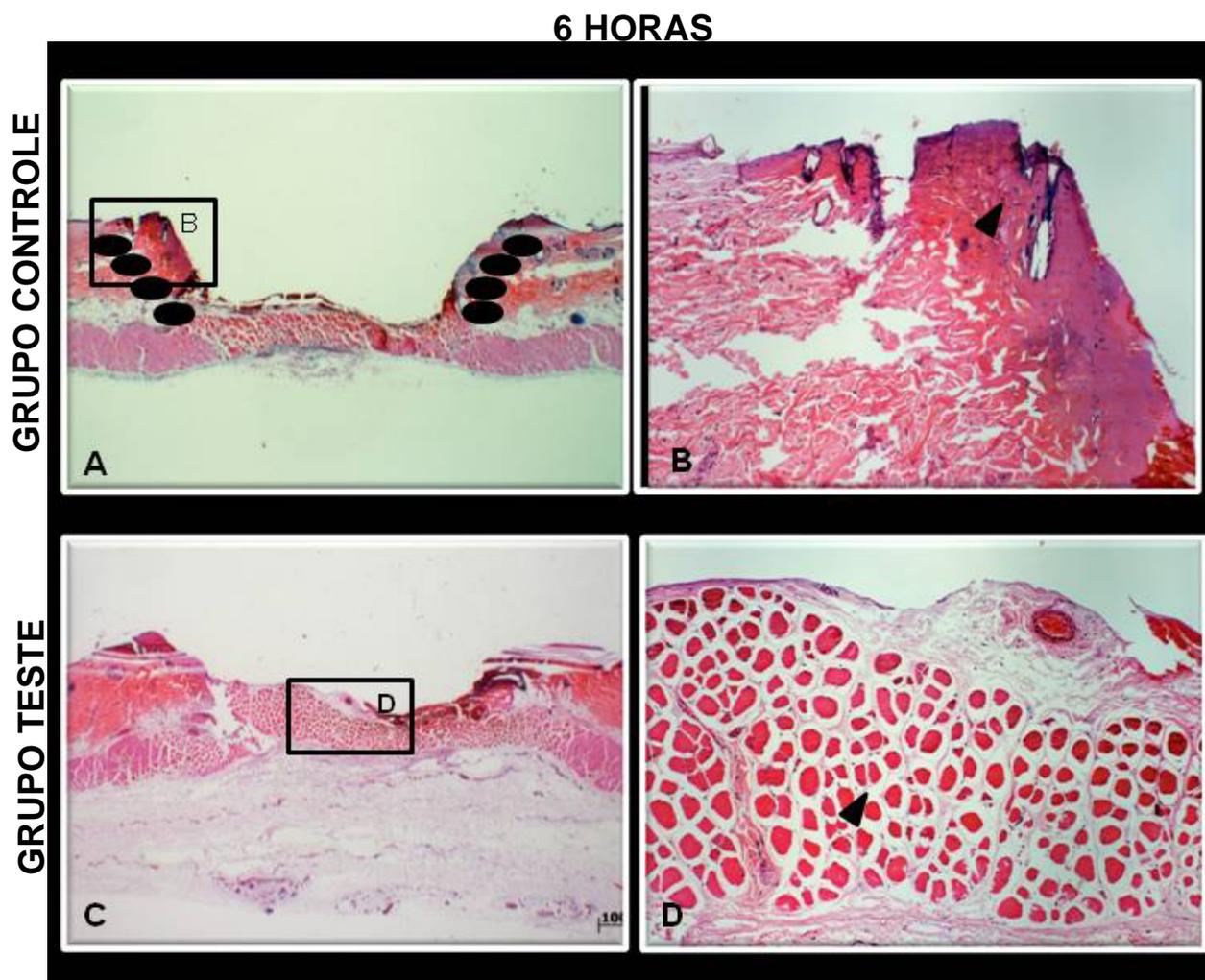
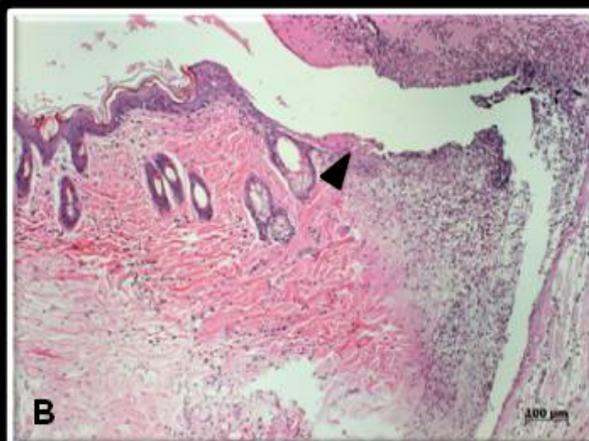
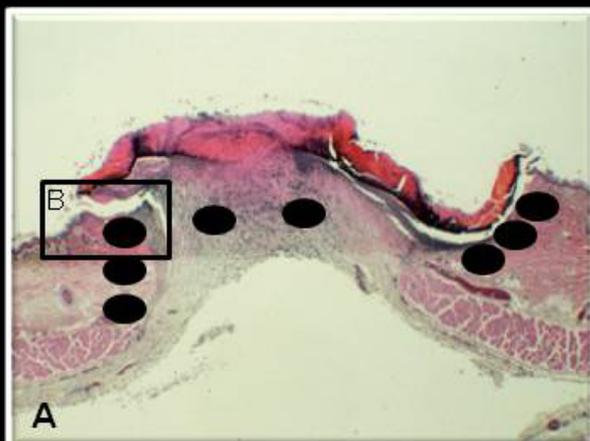


Figura 5.2 - A - Corte histológico da ferida do grupo controle no período de 6 horas corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Observa-se fragmento de pele exibindo descontinuidade epidérmica e dérmica, infiltrado inflamatório neutrofilico leve e edema moderado. O defeito se estende até a hipoderme apresentando fundo hemorrágico. Seleção dos campos para análise histomorfométrica (elipses pretas). B - Área delimitada em A (aumento original de 10X). Observa-se a presença de borda necrótica (cabeça de seta). C - Corte histológico da ferida do grupo teste no período de 6 horas corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Além das características encontradas nos cortes histológicos do grupo controle, observa-se na derme e no tecido adiposo da hipoderme intensa hiperemia (indicativo de vasodilatação). D - Área delimitada em C (aumento original de 10X). Nota-se intenso edema junto às fibras musculares (cabeça de seta)

3 DIAS

GRUPO CONTROLE



GRUPO TESTE

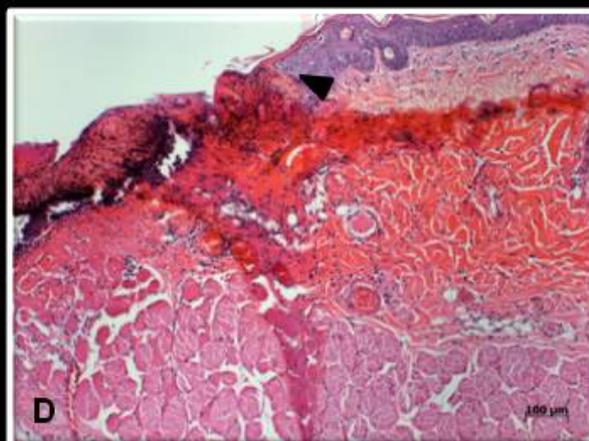


Figura 5.3 - A - Corte histológico da ferida do grupo controle no período de 3 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Observa-se fragmento de pele exibindo área de defeito e formação de "língua" epitelial. Nota-se intenso infiltrado inflamatório difuso, grande quantidade de fibrina e intensa hiperemia. Notar intensa substituição do coágulo sanguíneo por tecido de granulação. Seleção dos campos para análise histomorfométrica (elipses pretas). B – Área delimitada em A (aumento original de 10X). Observar-se o início da formação da "língua" epitelial (cabeça de seta). C - Corte histológico da ferida do grupo teste no período de 3 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). C – Além das características observadas no grupo controle, observa-se áreas focais de hemorragia na base do defeito. D – Área delimitada em C (aumento original de 10X). Observa-se o início da formação da "língua" epitelial (cabeça de seta)

7 DIAS

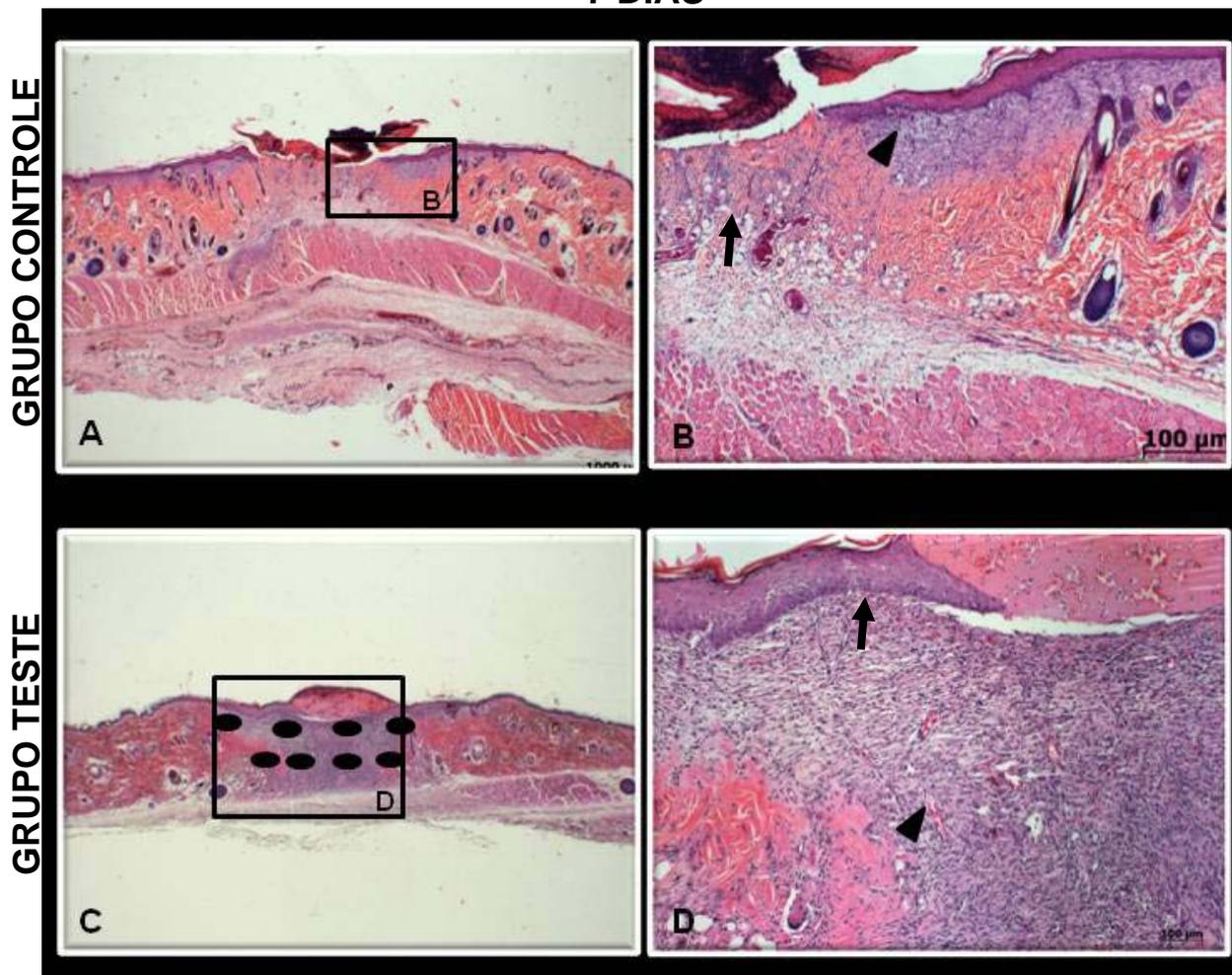


Figura 5.4 - A - Corte histológico da ferida do grupo controle no período de 7 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Observa-se o fragmento de pele com intensa reepitelização e remanescentes da “crosta” na superfície da ferida. B – Área delimitada em A (aumento original de 10X). Nota-se reepitelização com camadas de queratinócitos e camada basal exibindo hiperchromatismo (cabeça de seta). Observa-se tecido de granulação (seta). C - Corte histológico da ferida do grupo teste no período de 7 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Observar tecido de granulação exuberante. Seleção dos campos para análise histomorfométrica (elipses pretas). D – Área delimitada em C (aumento original de 10X). Nota-se reepitelização avançada (seta) e exuberante tecido de granulação e uma grande quantidade de fibras colágenas, fibroblastos jovens e vasos sanguíneos neoformados (cabeça de seta)

14 DIAS

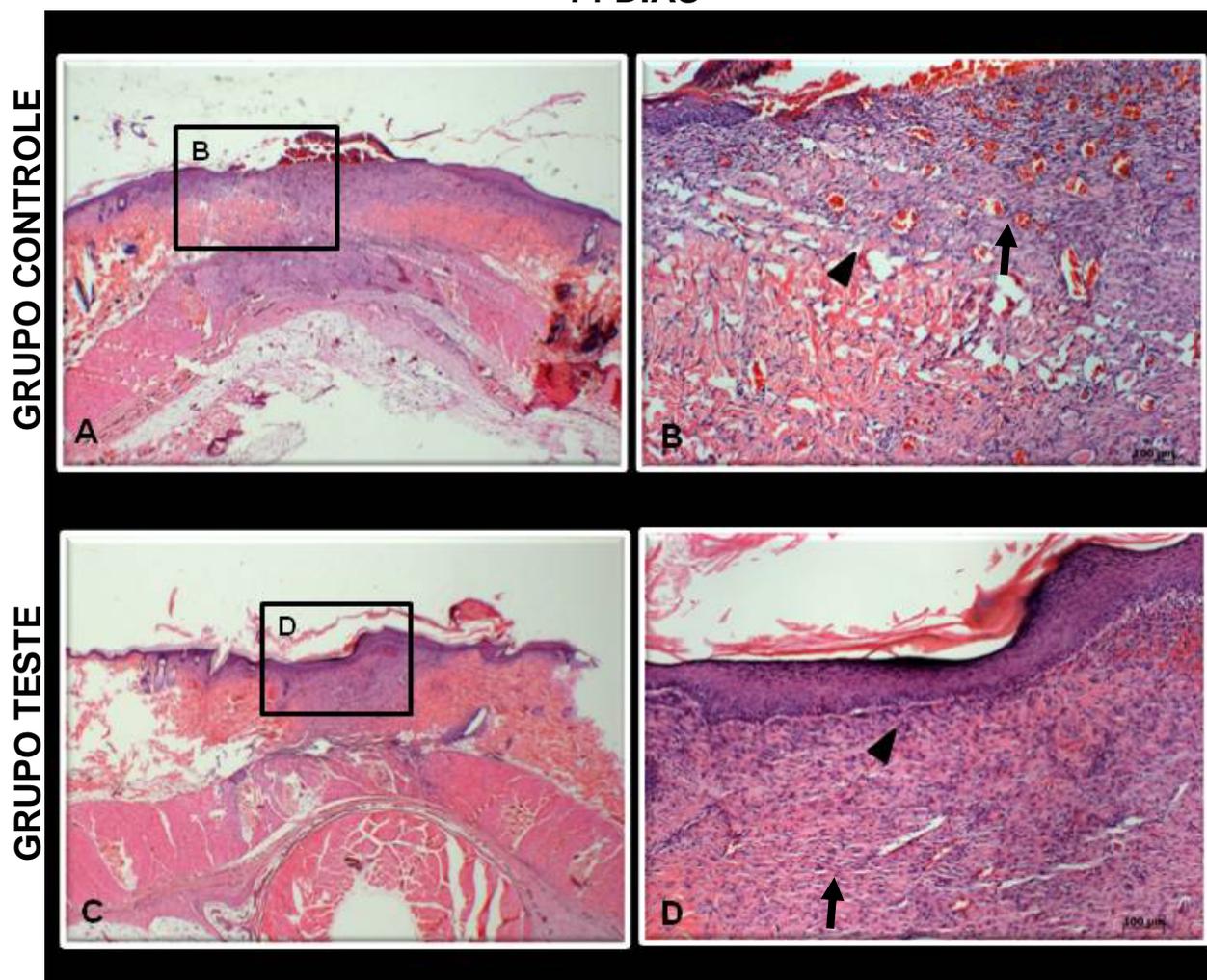


Figura 5.5 - A - Corte histológico da ferida do grupo controle no período de 14 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Nota-se reepitelização praticamente completa, presença de “ponte” epitelial com poucas camadas de queratinócitos e presença de discreta camada de queratina. Observa-se na derme tecido de granulação moderado. B – Área delimitada em A (aumento original de 10X). Tecido de granulação com substituição parcial dos feixes de fibras colágenas (cabeça de seta). Nota-se intensa hiperemia (seta) e vascularização na derme C - Corte histológico da ferida do grupo teste no período de 14 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Observa-se fragmento de pele exibindo reepitelização completa, com presença de “ponte” epitelial composta por várias camadas de queratinócitos e camada de queratina discreta. Nota-se tecido de granulação parcialmente substituído por feixes de fibras colágenas. D – Área delimitada em C (aumento original de 10X). Observa-se os feixes de fibras colágenas com tendência de distribuição paralela (seta). Nota-se reepitelização completa e presença de “ponte” epitelial (cabeça de seta)

21 DIAS

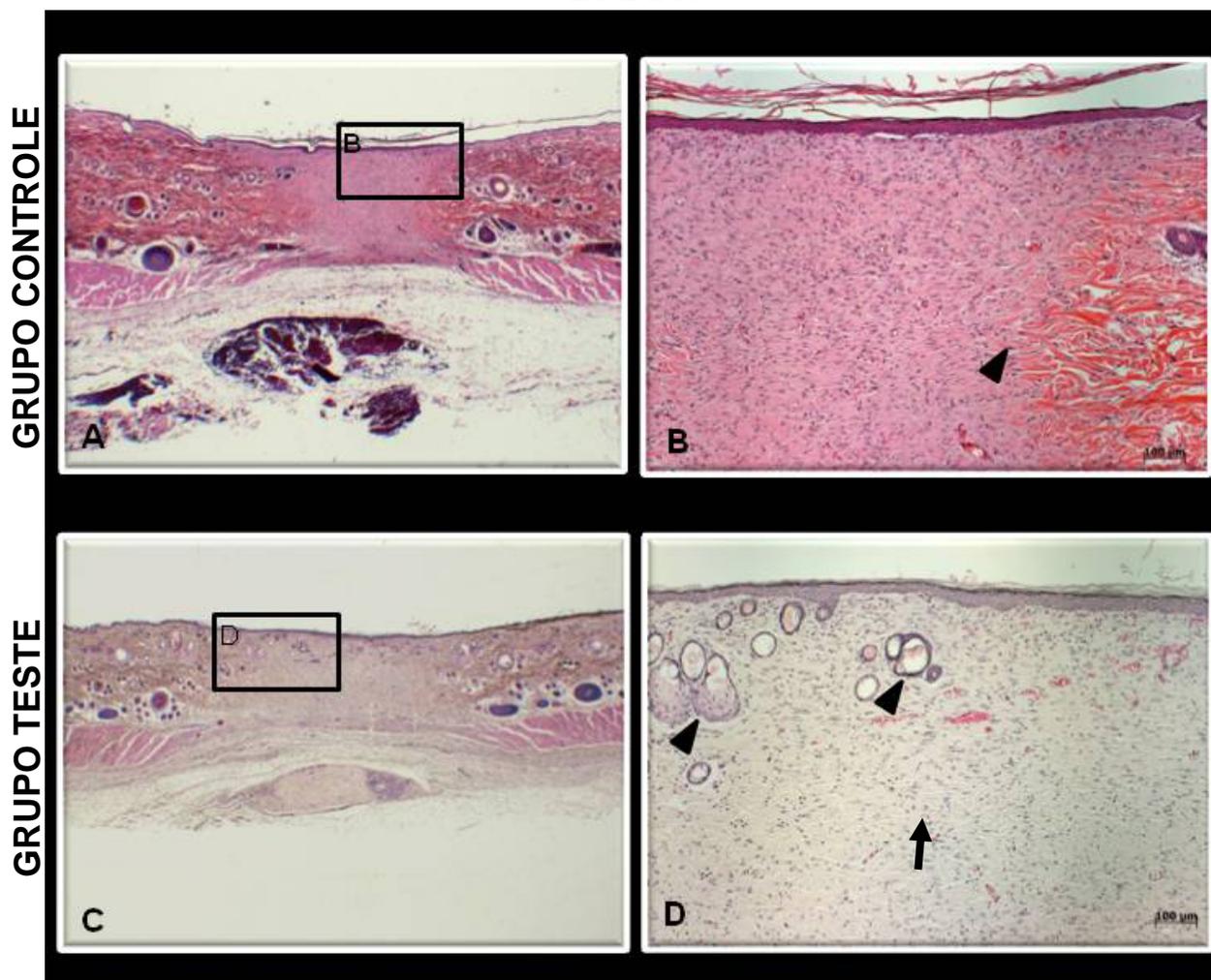


Figura 5.6 - A - Corte histológico da ferida do grupo controle no período de 21 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Nota-se o fragmento de pele exibindo reepitelização completa, epitélio delgado e moderada camada de queratina. Observa-se tecido de granulação moderado e poucos vasos sanguíneos. Na hipoderme observar fibras musculares em regeneração. B – Área delimitada em A (aumento original de 10X). Nota-se substituição parcial do tecido de granulação por grande quantidade de feixes de fibras colágenas distribuídas paralelamente entre si (cabeça de seta). C - Corte histológico da ferida do grupo teste no período de 21 dias corados com hematoxilina-eosina (aumento original de 2,5X). Nota-se fragmento de pele exibindo reepitelização completa composto por epitélio queratinizado com espessura similar ao epitélio pré-existente. D – Área delimitada em C (aumento original de 10X). Observa-se na derme área do defeito com grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos com distribuição paralela, substituindo totalmente o tecido de granulação (seta). Início da formação dos anexos cutâneos (cabeças de setas)

5.3.2 Análise histomorfométrica

Os dados da análise histomorfométrica digital, com relação às porcentagens de reepitelização e formação de tecido de granulação nos períodos estudados (3, 7, 14 e 21 dias) estão descritos nas tabelas 5.3 e 5.4.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para a variável reepitelização nos períodos de 3, 14 e 21 dias. No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes para esta variável no período de 7 dias (Tabela 5.3). Para a variável tecido de granulação, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 3 e 7 dias. Enquanto que, foram observadas diferenças estatisticamente significantes para esta variável nos períodos de 14 e 21 dias (Tabela 5.4).

Tabela 5.3 – Comparação dos dados da análise histomorfométrica digital para a variável reepitelização nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

Dias	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
3D	Teste	5	24.35	7.35	16.4	35.84	20.35	23.03	26.12	0.11
	controle	5	32.16	1.11	31.05	33.55	31.15	32.04	33.01	
	Total	10	28.25	6.44	16.4	35.84	23.8	31.1	32.77	
7D	Teste	5	10.56	7.35	5.5	13.52	10.63	10.75	12.41	0.01*
	Controle	5	15.45	2.25	13.22	18.95	13.84	15.24	16	
	Total	10	13.01	3.62	5.5	18.95	11.17	13.37	14.89	
14D	Teste	5	0.71	1.58	0	3.56	0	0	0	0.46
	Controle	5	5.624	7.74	0	15.12	0	0	13	
	Total	10	3.17	5.87	0	15.12	0	0	2.65	
21D	Teste	5	0	0	0	0	0	0	0	0.6
	Controle	5	0.25	0.57	0	1.27	0	0	0	
	Total	10	0.13	0.4	0	1.27	0	0	0	

*Diferença estatisticamente significativa

Tabela 5.4 – Comparação dos dados da análise histomorfométrica digital para a variável tecido de granulação nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

Dias	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
3D	Teste	5	154.17	18.23	137.74	180	139.36	148	161.3	0.46
	Controle	5	161.596	23.78	122.33	180.55	157.99	168.03	179.08	
	Total	10	157.88	20.35	122.33	180.55	141.52	161.87	176.32	
7D	Teste	5	110.93	17.07	97.94	136.62	99.81	99.83	115.3	0.17
	Controle	5	100.7	36.14	75.81	163.44	79.75	85.63	98.87	
	Total	10	105.82	27.19	75.81	163.44	88.71	99.34	115.3	
14D	Teste	5	29.68	14.57	5.54	43.05	27.85	34.43	36.8	0.009*
	Controle	5	95.34	32.57	73.86	151.49	75.91	79.48	95.99	
	Total	10	62.51	42	5.54	151.49	35.21	58.46	78.59	
21D	Teste	5	3.97	1.76	2.17	6.17	2.98	3.02	4.9	0.009*
	Controle	5	33.74	22.3	9.4	61.82	21.84	23.09	52.54	
	Total	10	18.85	21.65	2.17	61.82	3.64	7.79	22.78	

*Diferença estatisticamente significativa

Os dados da análise histomorfométrica digital, com relação às porcentagens de celularidade (C), espaço branco (EB) e matriz colagênica (MC) em relação aos períodos estudados (6 horas, 3, 7, 14 e 21 dias), estão descritos na tabela 5.5.

Pelo estudo quantitativo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo teste e controle em relação as 3 variáveis estudadas nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. Entretanto, encontramos uma diferença estatisticamente significativa para as variáveis EB e MC no período de 6 horas. No grupo teste, uma maior quantidade de EB (edema) e uma menor quantidade de MC (colágeno) foram encontradas no período de 6 horas.

Tabela 5.5 – Comparação dos dados da análise histomorfométrica digital para as variáveis espaço branco (EB), celularidade (C) e matriz colagênica (MC) nos períodos de 6 horas, 3, 7, 14 e 21 dias para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

continua...

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
EB 6h	Teste	5	51,93%	9,39%	44,29%	67,35%	44,55%	49,94%	60,31%	0,028*
	Controle	5	37,17%	8,06%	28,54%	47,71%	29,29%	hk	44,86%	
	Total	10	44,55%	11,34%	28,54%	67,35%	35,68%	44,55%	50,77%	
C 6h	Teste	5	3,00%	1,79%	1,20%	5,19%	1,23%	3,00%	4,76%	0,917
	Controle	5	2,62%	0,73%	2,00%	3,64%	2,01%	2,30%	3,38%	
	Total	10	2,81%	1,30%	1,20%	5,19%	1,82%	2,65%	3,81%	
MC 6h	Teste	5	45,07%	8,64%	31,39%	53,99%	37,56%	45,73%	52,26%	0,028*
	Controle	5	60,21%	7,71%	50,26%	67,95%	52,98%	59,31%	67,89%	
	Total	10	52,64%	11,10%	31,39%	67,95%	45,23%	52,26%	61,44%	
EB 3D	Teste	5	36,83%	5,75%	26,95%	41,64%	32,13%	38,46%	40,71%	0,917
	Controle	5	39,43%	10,41%	30,76%	55,06%	31,88%	33,14%	50,11%	
	Total	10	38,13%	8,05%	26,95%	55,06%	32,44%	37,88%	42,52%	
C 3D	Teste	5	8,57%	1,06%	6,91%	9,54%	7,63%	8,61%	9,49%	0,465
	Controle	5	6,94%	3,10%	2,24%	9,70%	3,88%	7,94%	9,51%	
	Total	10	7,76%	2,35%	2,24%	9,70%	6,56%	8,48%	9,46%	
MC 3D	Teste	5	54,61%	5,17%	50,78%	63,51%	51,11%	52,93%	58,94%	0,917
	Controle	5	53,63%	8,96%	42,70%	61,49%	43,92%	58,93%	60,70%	
	Total	10	54,12%	6,91%	42,70%	63,51%	49,37%	53,64%	60,31%	
EB 7D	Teste	5	28,45%	6,95%	21,20%	37,76%	21,78%	28,33%	35,18%	0,347
	Controle	5	34,87%	9,17%	25,93%	49,19%	26,90%	35,06%	42,75%	
	Total	10	31,66%	8,38%	21,20%	49,19%	25,03%	30,46%	36,68%	
C 7D	Teste	5	9,04%	3,53%	3,88%	12,95%	5,79%	9,11%	12,24%	0,465
	Controle	5	7,56%	2,57%	3,60%	9,49%	4,96%	9,10%	9,39%	
	Total	10	8,30%	3,01%	3,60%	12,95%	5,70%	9,11%	10,00%	
MC 7D	Teste	5	62,52%	4,95%	58,36%	68,53%	58,54%	59,70%	67,89%	0,251
	Controle	5	57,57%	7,94%	47,21%	67,76%	50,90%	55,45%	65,29%	
	Total	10	60,04%	6,76%	47,21%	68,53%	55,23%	59,21%	67,39%	
EB 14D	Teste	5	33,92%	13,08%	24,53%	56,76%	25,54%	30,06%	44,23%	0,917
	Controle	5	29,03%	5,46%	20,04%	33,64%	23,97%	31,28%	32,98%	
	Total	10	31,48%	9,79%	20,04%	56,76%	26,04%	30,67%	32,64%	
C 14D	Teste	5	5,02%	1,10%	3,41%	6,46%	4,10%	5,06%	5,92%	0,251
	Controle	5	6,01%	1,93%	2,99%	8,21%	4,34%	6,28%	7,56%	
	Total	10	5,52%	1,57%	2,99%	8,21%	4,44%	5,53%	6,57%	
MC 14D	Teste	5	61,06%	13,77%	36,78%	70,10%	50,83%	64,89%	69,38%	0,917
	Controle	5	64,96%	5,78%	60,51%	73,06%	60,59%	61,41%	71,09%	
	Total	10	63,01%	10,17%	36,78%	73,06%	60,63%	64,88%	69,36%	

(conclusão)

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
EB 21D	Teste	5	71,66%	5,19%	63,36%	76,58%	66,73%	74,04%	75,41%	0,175
	Controle	5	56,40%	18,77%	35,53%	75,71%	36,36%	64,03%	72,63%	
	Total	10	64,03%	15,27%	35,53%	76,58%	56,82%	69,81%	74,61%	
C 21D	Teste	5	3,01%	2,02%	0,96%	6,33%	1,58%	2,35%	4,78%	0,917
	Controle	5	3,34%	3,00%	1,23%	8,41%	1,38%	1,79%	6,09%	
	Total	10	3,18%	2,42%	0,96%	8,41%	1,45%	2,27%	4,40%	
MC 21D	Teste	5	25,33%	3,20%	22,46%	30,31%	23,02%	23,61%	28,50%	0,117
	Controle	5	40,26%	16,52%	22,50%	60,71%	25,72%	34,75%	57,56%	
	Total	10	32,80%	13,70%	22,46%	60,71%	23,31%	27,81%	39,66%	

*Diferença estatisticamente significativa

5.3.3 Análise imunoistoquímica

A análise quantitativa do número de miofibroblastos nos períodos de reparação das feridas foi realizada nos intervalos de tempo de 3, 7, 14 e 21 dias e estão ilustradas na tabela 5.6.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo teste e o grupo controle quanto ao número de miofibroblastos nos períodos de 3 e 7 dias. Entretanto, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados no período de 14 (Figura 5.7) e 21 dias (Figura 5.8). No grupo controle, um maior número de miofibroblastos foi encontrado quando comparado ao grupo teste nesses períodos ($p=0,016$).

Tabela 5.6 – Comparação dos dados da análise imunoistoquímica para o número de miofibroblastos nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias para o grupo teste (papaverina) e controle (placebo)

Variável	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Sig. (p)
P3D	Teste	5	1,32	0,65	0,60	2,30	0,80	1,10	1,95	0,754
	Controle	5	1,80	1,42	0,30	3,70	0,40	2,00	3,10	
	Total	10	1,56	1,07	0,30	3,70	0,58	1,35	2,35	
P7D	Teste	5	37,66	14,73	24,40	59,70	26,80	29,30	52,70	0,076
	Controle	5	56,68	6,79	46,30	64,40	50,40	58,60	62,00	
	Total	10	47,17	14,74	24,40	64,40	29,28	50,40	59,63	
P14D	Teste	5	16,48	15,47	7,00	43,90	7,60	11,30	27,95	0,016*
	Controle	5	49,90	16,67	23,60	68,40	35,05	54,20	62,60	
	Total	10	33,19	23,24	7,00	68,40	10,53	33,75	54,85	
P21D	Teste	5	5,22	2,69	2,10	9,00	2,75	5,10	7,75	0,016*
	Controle	5	12,78	3,43	7,30	16,80	10,25	13,20	15,10	
	Total	10	9,00	4,93	2,10	16,80	4,68	8,15	13,25	

*Diferença estatisticamente significativa

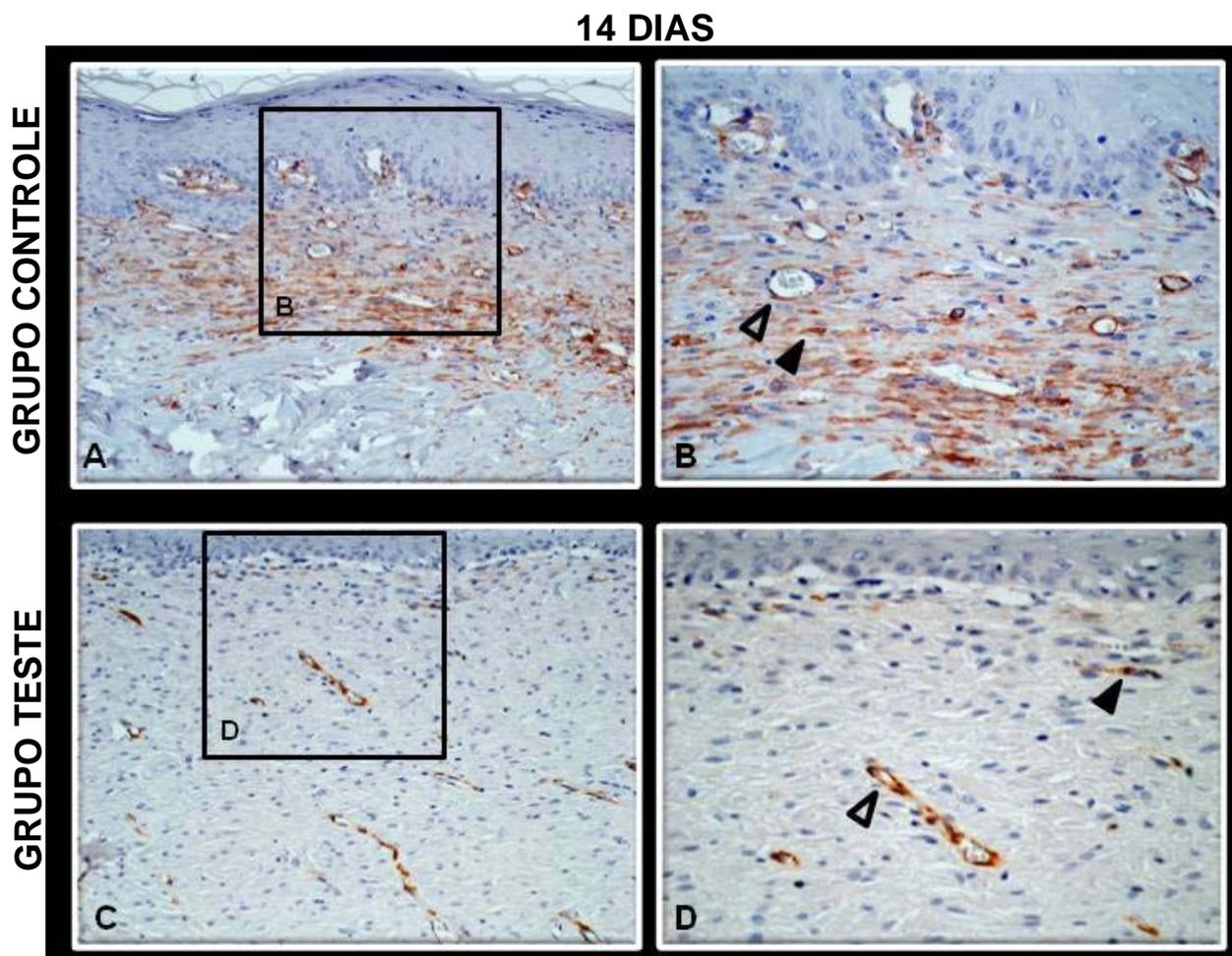


Figura 5.7 – Reações imunohistoquímicas com o anticorpo anti-actina de músculo liso (AML). A - Cortes histológicos das feridas cirúrgicas do grupo controle no período de 14 dias (aumento original de 20X). B – Área delimitada em A (aumento original de 40X). Observa-se grande quantidade de marcação positiva para miofibroblastos (cabeça de seta) assim como para parede vascular (cabeça de seta sem preenchimento). C - Cortes histológicos das feridas cirúrgicas do grupo teste no período de 14 dias (aumento original de 20X). D – Área delimitada em C (aumento original de 40X). Observa-se uma quantidade menor de marcação positiva para miofibroblastos (cabeça de seta) assim como para parede vascular (cabeça de seta sem preenchimento)

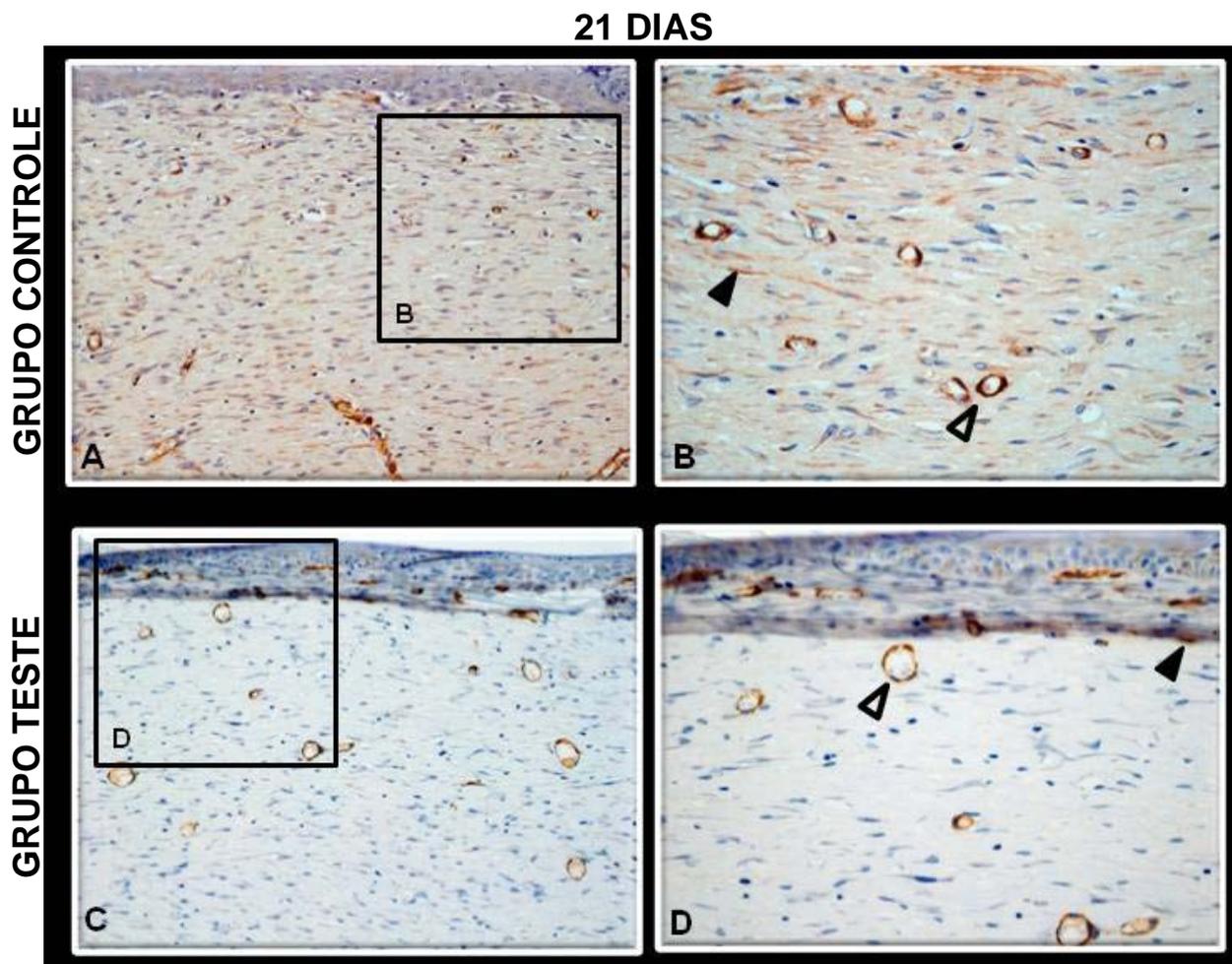


Figura 5.8 - Reações imunohistoquímicas com o anticorpo anti-actina de músculo liso (AML). A - Cortes histológicos das feridas cirúrgicas do grupo controle no período de 21 dias (aumento original de 20X). B – Área delimitada em A (aumento original de 40X). Observa-se grande quantidade de marcação positiva para miofibroblastos (cabeça de seta) assim como para parede vascular (cabeça de seta sem preenchimento). C - Cortes histológicos das feridas cirúrgicas do grupo teste no período de 21 dias (aumento original de 20X). D – Área delimitada em C (aumento original de 40X). Observa-se uma quantidade menor de marcação positiva para miofibroblastos (cabeça de seta) assim como para parede vascular (cabeça de seta sem preenchimento)

6 DISCUSSÃO

A papaverina é um relaxante de ação direta na musculatura lisa, usada no tratamento de impotência sexual e como vasodilatador, especialmente para o território cerebral (Morawski et al., 2003). Seu mecanismo parece envolver a combinação de inibição da fosfodiesterase (Thomas, 2002) e no bloqueio dos canais de cálcio (Gagnon et al., 1980). Conway e Weins (1980) mostraram que a utilização da papaverina diminui a resistência do fluxo sanguíneo pela promoção do relaxamento do músculo liso da parede vascular, provocando assim, uma vasodilatação. Segundo Thomas (2002), além de diminuir a resistência do fluxo arterial, a papaverina parece aumentar a resistência do fluxo venoso. A partir do modelo experimental utilizado neste estudo, comprovou-se a ação vasodilatadora da papaverina. Estes achados foram similares aos resultados encontrados na literatura (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999; Vilandt et al., 1999).

A papaverina pode ser administrada topicamente para a prevenção e tratamento dos espasmos dos enxertos arteriais em cirurgias cardiovasculares (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999; Vilandt et al., 1999), por via oral ou intracavernosa para o tratamento de disfunção erétil (Thomas, 2002) e na apresentação de creme para prevenção da contração dos enxertos de pele (Wang et al., 2004) e aceleração da expansão tecidual (Tang et al., 2004). Diante da literatura existente, nos propusemos a desenvolver um estudo, em modelo animal, com a finalidade de avaliar alguns dos efeitos biológicos da aplicação subcutânea da papaverina na reparação tecidual de feridas cirúrgicas dérmicas no dorso de ratos.

A cicatrização dos tecidos moles pode ser dividida em inflamação, formação do tecido de granulação e remodelação tecidual (Kiritsy; Lynch, 1993). Precocemente, a contração das células endoteliais resulta no aumento dos espaços entre as células endoteliais e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade vascular (saída de proteínas plasmáticas), principalmente nas vênulas e capilares, acompanhada de vasodilatação (Li et al., 2007). O exsudato inflamatório é fundamental para iniciar e manter os fenômenos vasculares da inflamação. Contém componentes que atuam direta ou indiretamente sobre o agente agressor, como os

anticorpos e o sistema complemento (Broughton et al., 2006). Ao mesmo tempo, liberam mediadores para a manutenção do exsudato inflamatório e quimiotaxia celular como aminas vasoativas (histaminas e serotoninas), bradicinina, produtos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienes), citocinas e fatores de crescimento (Li et al., 2007). Neste estudo, a presença de um exsudato inflamatório pós-cirúrgico proveniente do cálculo do peso dos fragmentos e da análise histomorfométrica mostraram que o edema foi mais intenso no período inicial para grupo teste (PAP). Ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para as variáveis espaço branco (EB) ($p= 0,028$) e matriz colagênica (MC) ($p= 0,028$) no período de 6 horas. Foi observada maior porcentagem de edema, maior espaço entre as fibras colágenas e conseqüentemente, menor porcentagem de matriz colagênica no grupo teste. A maior exsudação plasmática inicial pode ser justificada pela ação vasodilatadora da papaverina (Chavanon et al., 1999; Thomas, 2002). Essa fase inflamatória é um mecanismo importante de defesa tecidual dos tecidos conjuntivos, pois depende dos vasos para levar, até a área agredida, as células e substâncias necessárias ao controle do agente agressor, e em seguida, reparar a área afetada (Eming et al., 2007). Acredita-se que a microcirculação sanguínea abundante e o maior grau de permeabilidade vascular podem proporcionar ao tecido maior capacidade de desencadeamento de um processo inflamatório mais intenso e rápido frente ao agente agressor.

De acordo com a análise morfométrica, os resultados provenientes do processo de fechamento da ferida/formação de cicatrizes revelaram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para as variáveis área, perímetro e fator de forma nos períodos de 6 horas, 3 e 14 dias. Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação à área e perímetro nos períodos de 7 e 21 dias. No grupo teste, o aumento da área e perímetro ocorreu mais intensamente até o 3° dia (sem diferença estatística significante entre os grupos). No entanto, essas variáveis foram diminuindo de forma progressiva em relação aos períodos de 7,14 e 21 dias. Nas feridas do grupo controle, o aumento da área e perímetro ocorreu mais intensamente até o 7° dia, concordando com relatos da literatura (Mawaki et al., 2007), mostrando diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p=0,016$) e diminuindo de forma progressiva após esse período de observação. O aumento significativo dessas variáveis observado no grupo controle, nos períodos iniciais de reparação, pode

estar relacionado ao processo inflamatório agudo, concordando com os relatos da literatura (Kiritsy; Lynch, 1993; Mawaki et al., 2007). Uma fase inflamatória aguda mais prolongada do grupo controle parece ter influenciado para o menor fechamento da ferida e maior formação de cicatriz no período de 21 dias.

Um aspecto importante diz respeito à fase de formação do tecido de granulação. Este processo ocorre com a migração das células inflamatórias, macrófagos, fibroblastos, fibroblastos jovens e vasos sanguíneos para a área da ferida (Broughton et al., 2006), portanto, fundamental para recuperar a integridade do tecido agredido (Kiritsy; Lynch, 1993). No presente estudo, a análise histomorfológica mostrou uma maior formação do tecido de granulação no período de 7 dias para o grupo teste, onde já era observada intensa neovascularização, infiltrado inflamatório moderado e grande quantidade de fibroblastos jovens em concordância com dados da literatura (Kiritsy; Lynch, 1993). Igualmente, um intenso processo de reepitelização das feridas e a formação inicial das fibras musculares na hipoderme era um achado evidente para este grupo neste período. A análise histomorfométrica demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a mesma variável onde, uma maior porcentagem de tecido de granulação nos períodos de 14 e 21 dias foi observada no grupo controle ($p=0,009$). Após a deposição das fibras colágenas, tanto as forças mecânicas endógenas (tecido de granulação) quanto às exógenas afetam o microambiente da ferida. Acredita-se que, com a substituição gradual do tecido de granulação ocorre a diminuição da intensidade de força endógena da ferida e assim, foi observada uma tendência de distribuição paralela dos feixes de fibras colágenas em relação à superfície da pele (Farahani; Kloth, 2008). Em nosso experimento, nos períodos de 14 e 21 dias, observamos no grupo teste, um tecido de granulação parcial e completamente substituído por feixes de fibras colágenas cuja distribuição se deu conforme os relatos da literatura (Wang et al., 2004; Farahani; Kloth, 2008). Provavelmente isto tenha ocorrido, pois as fibras colágenas tendem a seguir a orientação das forças mecânicas exógenas exercidas sobre elas. Acredita-se que, à medida que o processo de reparação da ferida avança, ocorre uma maior substituição do tecido de granulação e a orientação das fibras de colágeno adquire um padrão mais uniforme e paralelo à superfície da pele (Farahani; Kloth, 2008).

Em nosso modelo experimental, optamos em realizar uma incisão circular padronizada no dorso de ratos gerando uma ferida cirúrgica aberta para induzir o

processo de cicatrização por segunda intenção e, conseqüentemente, contração tecidual. Em resposta a perda tecidual, a hipótese mais aceita é a de que fibroblastos e miofibroblastos possam gerar forças contráteis no centro da ferida acarretando, portanto, uma aproximação das bordas através das conexões celulares e extracelulares (Baker et al., 1981; Farahani; Kloth, 2008). Além disso, o tecido de granulação é importante para a orientação do processo de reparação. A sua presença na área da ferida foi necessária para avaliar alguns eventos biológicos da reparação após a utilização da papaverina e sua possível ação na contratibilidade dos miofibroblastos (Farahani; Kloth, 2008).

Os miofibroblastos são células diferenciadas com características semelhantes aos fibroblastos e células do músculo liso (Baker et al., 1981; Van Beurden et al., 2005). Estas células possuem um aparelho contrátil composto por uma rede de microfilamentos de α -actina e outras proteínas associadas, como a miosina, semelhantes às fibras de estresse, sendo importantes na geração de força motriz e locomoção celular (Tomasek et al., 2002). Estudos em modelo animal mostraram a participação dos miofibroblastos no processo de reparação e contração de feridas que cicatrizam por segunda intenção (Tanaka et al., 2004; Beare et al., 2005; Mawaki et al., 2007). Acredita-se que os miofibroblastos apareçam precocemente nas margens da ferida no 4º dia e no centro da ferida no 6º dia (Tanaka et al., 2004; Mawaki et al., 2007). Em nosso estudo, os miofibroblastos apareceram em ambos os grupos nos períodos iniciais do processo de reparação (3 -7 dias), porém, sem diferença estatisticamente significativa, confirmando os dados da literatura. Entretanto, o grupo controle apresentou um número maior de miofibroblastos ($p = 0,016$) quando comparado ao grupo teste nos períodos de 14 e 21 dias. Devido ao aumento da área e do perímetro das feridas do grupo controle no período de 7 dias (provocado pelo edema na fase de inflamação aguda), as bordas das feridas foram afastadas produzindo um estresse mecânico (Mawaki et al., 2007). Estimulados pelo estresse mecânico, ED-A FN e pelo fator de crescimento β transformador (TGF- β 1) produzido pelas células inflamatórias (Gabbiani, 2003), os fibroblastos se diferenciam num primeiro momento em proto-miofibroblastos e posteriormente em miofibroblastos (Tomasek et al., 2002). Um maior estresse mecânico no grupo controle pode ter sido gerado pelo afastamento das bordas das feridas no período de 7 dias. Este fator associado à maior liberação de TGF- β 1, parece ter levado a uma manutenção do tecido de granulação e uma maior diferenciação de

miofibroblastos nos períodos de 14 e 21 dias. Nos casos onde ocorrem alterações dos miofibroblastos, a contração tecidual pode ser prematura ou excessiva, aumentando o risco à formação de cicatriz e/ou fibrose (Tomasek et al., 2002; Ping et al., 2005; Farahani; Kloth, 2008), desfavorecendo a estética e limitando a função da região afetada. No grupo controle, a análise morfológica quantitativa demonstrou um menor fechamento da ferida e uma formação de cicatriz maior quando comparado com o grupo teste nos períodos de 7 e 14 dias ($p = 0,016$).

Na reparação de feridas cirúrgicas, concomitantemente à formação do tecido de granulação, ocorre o processo de reepitelização (Eming et al., 2007). Estimulados pelo EGF, KGF e TGF- α ocorre a proliferação e migração das células epidérmicas e queratinócitos para reconstruir a continuidade tecidual, formação de uma “língua” epitelial a partir das bordas da ferida e a restauração de uma camada basal intacta que conecta a epiderme e a derme subjacente (Li et al., 2007). As células epiteliais são uma das fontes mais importantes de fatores de crescimento como PDGF, TGF- β e TGF- α durante o processo de reparação de feridas cutâneas (Kiritsy et al., 1993). Estes dados sugerem que os fatores de crescimento produzidos pelas células epiteliais, podem sinalizar sobre os componentes do tecido conjuntivo adjacente a área da ferida, e assim, parecem exercer função na formação do tecido de granulação. Foi observado na análise histomorfológica, um processo de reepitelização mais rápido do grupo teste quando comparado ao grupo controle. Na análise histomorfométrica, uma diferença estatisticamente significativa para o grupo teste em relação à reepitelização foi observada no período de 7 dias ($p = 0,01$). Quando a reepitelização está avançada, ocorre uma diminuição dos elementos celulares, principalmente dos miofibroblastos, no tecido de granulação por meio de apoptose (Tomasek et al., 2002; Farahani; Kloth, 2008). Em nosso estudo, uma diminuição da quantidade de tecido de granulação ($p = 0,09$) e no número de miofibroblastos ($p = 0,016$) do grupo teste ocorreu nos períodos de 14 e 21 dias quando comparada ao grupo controle. O processo de reepitelização mais avançado deste grupo, pode ter gerado uma organização precoce do tecido de granulação no 7º dia, diminuição do número de miofibroblastos nos períodos de 14 e 21 dias e conseqüentemente ter melhorado o processo de reparação.

Nos tecidos que contêm miofibroblastos, a contração e/ou o relaxamento tecidual pode ser induzido por agentes farmacológicos agonistas e antagonistas do músculo liso (Majno et al., 1971; Madden et al., 1974). Evidências mostraram que,

quando utilizada a papaverina, em 75% dos pacientes, o tecido capsular humano formado ao redor de implantes mamários de silicone respondeu ao relaxamento (Baker et al., 1981). A provável razão pela qual ocorreu essa resposta à papaverina foi pela presença dos miofibroblastos, que apresentam características de células musculares lisas (Rudolph et al., 1978).

Atualmente, a papaverina está sendo utilizada em cirurgias plásticas reconstrutivas (Tang et al., 2004). Acredita-se que no processo de expansão tecidual, a contratibilidade dos miofibroblastos pode ser responsável pela contração das cápsulas fibrosas inseridas no dorso dos animais. Os autores ressaltaram que a utilização do creme de papaverina parece acelerar o padrão de expansão tecidual, sendo um método simples e efetivo. Diante da metodologia aplicada, o efeito da papaverina pode persistir em concentração efetiva *in vivo* em animais por até 12 horas, observando uma ação direta da droga nos miofibroblastos. No entanto, quando a droga foi aplicada sistemicamente, sua meia vida plasmática foi de 2 horas, não apresentando ação sobre essas células (Tang et al., 2004). No presente estudo, devido ao desenho do modelo experimental, com a aplicação subcutânea de papaverina nas feridas cirúrgicas no período inicial, acredita-se que não houve uma ação direta desta droga na contratibilidade dos miofibroblastos, que apareceram na área da ferida por volta do 3º dia. Entretanto, devido à ação vasodilatadora da papaverina, a presença de um maior edema na fase inflamatória do processo de reparação, parece ter refletido em um maior extravasamento de proteínas plasmáticas, liberação de citocinas, fatores de crescimento e produtos do ácido araquidônico, potencializando a fase inicial de reparação. Este fator parece ter acelerado as fases do processo de reparação das feridas cirúrgicas, proporcionando uma proliferação epitelial mais rápida, organização precoce do tecido de granulação, menor sinalização para diferenciação dos miofibroblastos nos períodos tardios e conseqüentemente uma menor contração tecidual e formação de cicatrizes.

Não existe um consenso na literatura no que tange a concentração e posologia ideais da papaverina para obter sua ação terapêutica, variando de acordo com o tratamento realizado e a apresentação da droga (Baker et al., 1981). Os estudos que avaliaram a eficácia da papaverina para o tratamento de disfunção erétil não se mostraram consistentes, mas as concentrações da droga podem se estender de 15 à 60mg (Thomas, 2002). Quando utilizada na prevenção e tratamento dos espasmos de enxertos arteriais, em cirurgias cardiovasculares (Chavanon et al.,

1999), sua concentração varia de 6mg/mL à 30mg/mL, podendo ser aplicada topicamente (Fuat Bilgen et al., 1996; Uydes Dogan et al., 1996; Walpoth et al., 1996; Ahsan et al., 1997; Chavanon et al., 1999) ou intraluminal (Wendler et al., 1999) nos enxertos arteriais antes da intervenção cirúrgica. Quando apresentada em forma de creme para prevenção da contração dos enxertos de pele (Wang et al., 2004) e nos casos de da expansão tecidual (Tang et al., 2004), a papaverina é utilizada a 2%. Em nosso estudo, optamos pela aplicação subcutânea da papaverina 50mg/mL baseados nos relatos de Thomas (2002). Esta concentração da papaverina parece promover benefícios no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos.

Com relação ao metabolismo da papaverina, Kanto et al. (1979) observaram que após a administração por via oral de 300mg papaverina, sua concentração plasmática não se manteve após 12 horas, demonstrando que a vida média plasmática da droga é curta. Wilen e Ylitalo (1982) encontraram resultados similares ao administrar por via oral 200 mg de papaverina. Observaram que o pico de concentração plasmática da droga ocorre 2 horas após a administração. De acordo com os autores, a excreção da papaverina e seus metabólitos ocorrem em duas fases distintas: uma rápida eliminação nas primeiras 6-8 horas, seguida de uma eliminação mais lenta durante as 24 horas seguintes. Após 48 horas, a papaverina é quase totalmente absorvida pelo trato gastrointestinal e, portanto, rapidamente metabolizada. Por outro lado, após o uso tópico do creme de papaverina, sua concentração plasmática efetiva pode persistir por até 12h (Tang et al., 2004).

Atualmente, apesar da ampla utilização da papaverina em cirurgias microvasculares, sua aplicação parece estar baseada em conceitos empíricos (Yu et al., 2010). Neste contexto, serão necessárias mais pesquisas sobre os efeitos biológicos da papaverina, principalmente em feridas dérmicas e sua possível ação na contratibilidade dos miofibroblastos, no intuito de acrescentar subsídios científicos importantes para acelerar o processo de reparação, prevenir ou minimizar suas seqüelas (contração e cicatrizes) e assim, fundamentar seu possível uso clínico.

7 CONCLUSÕES

Após avaliação dos resultados obtidos, é possível concluir que:

1. Dentro dos limites deste estudo, a aplicação subcutânea do cloridrato de papaverina acelerou o processo de reparação de feridas cirúrgicas abertas no dorso de ratos.
2. A aplicação do cloridrato de papaverina promove vasodilatação e um maior exsudato inflamatório no início do processo de reparação. Tal efeito pode estar relacionado com a maior velocidade de reparação observada macro e microscopicamente.

REFERÊNCIAS¹

Ahsan TA, Montgomery WD, Santamore WP, Spence PA. Preventing gastroepiploic artery spasm: Papaverine vs Calcium channel blockade. *J Surg Res.* 1997;71:41-8.

Baker JL, Chandler ML, Le Vier RR. Occurrence and activity of myofibroblasts in human capsular tissue surrounding mammary implants. *Plast Rescons Surg.* 1981;68:905-12.

Beare AH, Krane SM, Ferguson MW. Variable impairment of wound healing in the heterozygous collagenase-resistant mouse. *Wound Repair Regen.* 2005;13:27-40.

Bernacchio RMG. Avaliação da reparação em tecido cutâneo de ratos submetidos à incisão cirúrgica com lasers de CO2 e diodo, bisturi elétrico e convencional. Uma análise imunoistoquímica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.

Boswell Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Brit J Pharmacol.* 2006;147:S252-57.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic Science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(Suppl):12S-34S.

Conway R, Weiss H. Effect of papaverine on regional cerebral blood flow and small vessel blood content. *Eur J Pharmacol.* 1980;68:17-24.

Chavanon O, Cracowski JL, Hacini R, Stanke F, Durand M, Noirclerc M, et al. Effect of topical vasodilators on gastroepiploic artery graft. *Ann Thorac Surg.* 1999; 67:1295-8.

Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem.* 2007;42:115-70.

Farahani RM, Kloth LC. The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited. *Int Wound J.* 2008;5:477-82.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Fernandes LC, Matos D, Novelli MD, Kim SB. Comparative study of intestinal anastomosis with manual suture and biofragmentable ring in dogs under corticosteroid administration. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(2):113-20.

Fuat Bilgen MD, Yapici MF, Serbetçioğlu A, Tarhan A, Çoruh T, Ozler A. Effect of normothermic papaverine to relieve intraoperative spasm of the internal thoracic artery. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:769-71.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200:500-3.

Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol.* 1978;76:561-68.

Gagnon G, Regoli D, Rioux F. Studies on the mechanism of action of various vasodilators. *Br J Pharmac.* 1980;70:219-27.

Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:538-46.

Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblasts differentiation. *Am J Pathol.* 2001;159:1009-20.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The Myofibroblasts. One function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170:1807-16.

Jester JV, Hung J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGFbeta induced myofibroblasts differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75:645-57.

Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: A review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(5):729-760.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatol.* 2007;25:9-18.

Luomanen M, Lehto VP, Meurman JH. Myofibroblasts in healing laser wounds of rat tongue mucosa. *Arch Oral Biol.* 1988;33(1):17-23.

Madden JW, Morton DJr, Peacock EEJr. Contraction of experimental wounds: I. Inhibiting wound contraction by using a topical smooth muscle antagonist. *Surgery*. 1974;76:8.

Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: Similarity to smooth muscle. *Science*. 1971;173:548.

Matos D, Saad S, Francischi JRO, Barreto EP, Novelli MD. Colonic anastomosis with the biofragmentable ring manual suture. An experimental and comparative study. *Coloproctol*. 1994;16(3):169-73.

Mawaki A, Nakatami T, Sugama J, Konya C. Relationship between the distribution of myofibroblasts, and stellar and circular scar formation due to the contraction of square and circular wound healing. *Anat Sci Int*. 2007;82:147-55.

Morawski K, Telischi FF, Namyslowski G, Lisowska G, Lonsbury-Martin B. Preventing internal auditory artery vasospasm using topical papaverine: An animal study. *Otol Neurotol*. 2003;24(6):918-26.

Ping C, Hinz B, Swartz MA. Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro. *J Cell Sci*. 2005;118:4731- 39.

Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. *Pharmacology*. 6th. ed. USA: Churchill Livingstone; 2008.

Rossum MV, Walboomers VXF, Hoekstra MJ, Jansen SJA. The influence of a PHI-5-loaded silicone membrane, on cutaneous wound healing in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:1449-56.

Rudolph R, Abraham J, Vecchione T, Guber S, Woodward M. Myofibroblasts and free silicon around breast implants. *Plast Reconstr Surg*. 1978;62:185.

Schilling J. Wound healing. *Surg Clin North Am*. 1976;56:859.

Silver FH, Siperko LM, Seehra GP. Mechanobiology of force transduction in dermal tissue. *Skin Res Technol*. 2003;9:3-23.

Spanakis SG, Petridou S, Masur SK. Functional gap junctions in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1320-8.

Takeharu K, Takeuchi Y, Matsui H, Shimizu K, Urakawa N, Nakajyo S. Inhibitory mechanism of papaverine on carbachol-induced contraction in bovine trachea. *J Pharmacol Sci.* 2005;98:275-82.

Tanaka A, Nakatani T, Sugama J, Sanada H, Kitagawa A, Tanaka S. Histological examination of the distribution change of miofibroblasts in wound contraction. *Euro Wound Manage Assoc.* 2004;4:13-20.

Tang Y, Jie L, Xuhui Z. Accelerating Tissue Expansion by Application of Topical Papaverine Cream. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(5):1166-9.

Thomas JA. Pharmacological aspects of erectile dysfunction. *J Pharmacol.* 2002;89:101-12.

Tomasek JJ, Gabbian G, Hinzi B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 3(5):349-63.

Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:203-24.

Traina AA. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Uydes Dogan BS, Nebigil M, S-Aslamaci MD, Onuk E, Kanzik I, Akar F. The comparison of vascular reactivities of arterial and venous grafts to vasodilators: Management of graft spasm. *Int J Cardiol.* 1996;53:137-45.

Van Beurden HE, Hoff VD, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res.* 2005;84(10): 871-80.

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblasts. *Exp Cell Res.* 2000;257:180-9.

Vilandt J, Kjaergard H, Aggestrup S, Andreassen JJ, Olesen A. Intraluminal Papaverine with ph 3 doubles blood flow in the internal mammary artery. *Scand Cardiovasc J.* 1999;33:330-2.

Walpoth BH, Mohadjer A, Gersbach P, Rogulenko R, Walpoth BN, Althaus U. Intraoperative internal mammary artery transit-time flow measurements: comparative evaluation of two surgical pedicle preparation techniques. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 1996;10:1064-70.

Wang Q, Luan J, Wang JQ, Tang Y, Fan JC, Cao Y et al. Experimental study on inhibition of skin graft contraction with papaverine cream. *Zhonghua Zeng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004;20(6):461-3.

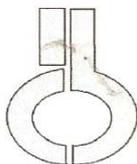
Wendler O. Free flow capacity of skeletonized versus pedicled internal thoracic artery grafts in coronary artery bypass grafts. *Eur J Cardio-Thorac Surg* 1999;16:247-50.

Wilén G, Ylitalo P. Metabolism of [14 C] papaverine in man. *J Pharm Pharmacol*. 1982;34:264-66.

Wong MEK, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1996;82(5):475-92.

Yu JT, Patel AJ, Malata CM. The use of topical vasodilators in microvascular surgery, *JPRAS*. 2010; ***In Press, Corrected Proof***.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **052** nas fls. **45** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Jarbas Arruda Bauer** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação histológica da reparação de feridas padronizadas em pele de ratos com uso da solução e do creme de papaverina**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Rodrigo Carlos Nahas de Castro Pinto** e o pesquisador **Giuseppe Alexandre Romito**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA- ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA – ICB/USP