UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

MARCIO CARUSO

"HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA DO PAPEL DA LACTOFERRINA EM IMPORTANTES EVENTOS DE INJÚRIA INTESTINAL E CUTÂNEA, EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO"

Araraquara SP

2011

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

MARCIO CARUSO

"HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA DO PAPEL DA LACTOFERRINA EM IMPORTANTES EVENTOS DE INJÚRIA INTESTINAL E CUTÂNEA, EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" UNESP Campus Araraquara, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Araraquara SP

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Caruso, Marcio
C331h Histologia e histomorfometria do papel da lactoferrina em importantes eventos de injúria intestinal e cutânea, em animais de experimentação / Marcio Caruso. – Araraquara, 2011
132 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Valdir Augusto Neves

. 1. Caseína. 2. Cicatrização. 3. Colágeno. 4. Criptas. 5. Enteranastomose. 6. Lactoferrina. 7. Miofibroblasto. 8. Pele. 9. Soja, I.Neves, Valdir Augusto, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

MARCIO CARUSO

“HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA DO PAPEL DA LACTOFERRINA EM IMPORTANTES EVENTOS DE INJÚRIA INTESTINAL E CUTÂNEA, EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO”

TESE APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
Orientador e Presidente

_____

Prof. Dr. Alfredo Di Vito Neto

_____

Profa Dra Aureluce Demonte

_____

Prof. Dr. Carlos Benatti Neto

_____

Prof. Dr. José Ângelo Camilli

Aprovado em
16/12/2011

AGRADECIMENTOS

A todos os funcionários e técnicos de laboratório pela atenção e carinho.

Aos funcionários e bibliotecárias da Biblioteca da FCF pela atenção e eficiência, em especial à *Sônia Mara Alves Scutari*

A todo o corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição pelos conhecimentos transmitidos.

Á *Claudia Lúcia Molina, Laura Rosim, Sônia Ornellas Silva e Márcia Regina Buda Adloff* da seção de pós-graduação, pela presteza, eficiência e carinho.

À *Rita de Cássia Riqueto e Andreza Padovini*, auxiliares e amigas, pela dedicação e ajuda.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, no nome da *Profa. Dra. Célia Maria de Sylos*

Ao *Prof. Dr. Dalton Geraldo Guaglianoni* pela inestimável ajuda nos cálculos estatísticos.

Aos Membros e Suplentes da Banca Examinadora: *Prof. Dr. Adilson César Abreu Bernardi*, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar; *Prof. Dr. Alfredo Di Vito Neto*, da Universidade Camilo Castelo Branco; *Profa. Dra Aureluce Demonte*, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP - Araraquara; *Prof. Dr. Carlos Benatti Neto*, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP - Araraquara; *Prof. Dr. Carlos César Crestani*, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP - Araraquara ; *Prof. Dr. Elizeu Antonio Ro*ssi, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP – Araraquara; *Prof. Dr. José Ângelo Camilli*, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; *Profa. Dra. Thalita Pedroni Formariz*, do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA*;* *Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri*, do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA; pela incomensurável ajuda, na doação do seu tempo e pelas sugestões e correções.

em especial

Ao *Prof. Dr. Valdir Augusto Neves*, meu orientador, pela confiança depositada em minha pessoa e excepcional capacidade de orientar respeitando a individualidade.

Aos meus pais, *Nair Nelly Ultramare Caruso e Waldemar Caruso* pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos *Murilo João e Enrico Caruso*, e meu grande amigo, quase irmão, *João Oscar Dentillo*, pelo apoio constante.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Edgard Drouet* (em memória), meu sogro, grande estimulador da pesquisa científica e à minha sogra, segunda mãe, *Ruth Caribé da Rocha Drouet*

À *Sandra e Catarina*, esposa e filha pelo incansável estímulo, carinho e dedicação.

Minha deferência especial a todos os animais cujas vidas foram o fruto desse e de qualquer outro trabalho científico.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

a *Waldemar Caruso*, artista-pintor, pai e amigo eternamente presente (em memória),

dedico.

SUMÁRIO

Lista de Figuras V
Lista de Tabelas VIII
Lista de Quadros VIII
Apêndices VIII
Abreviaturas e Símbolos IX
RESUMO XII
ABSTRACT XIII

1 - INTRODUÇÃO 1
1.1 Justificativa 3
1.2 Objetivos 4
2 - REVISÃO DA LITERATURA 5
2.1 Fatores de Crescimento 6
2.2 Processos Biológicos da Cicatrização e Regeneração Tecidual 8
Coagulação 9
Inflamação 9
Proliferação 12
Fibroplasia 12
Angiogênese 13
Reepitelização 14
Contração da Ferida 17
Miofibroblastos 18
Remodelação 20
2.3 O Colágeno 21
2.4 Considerações sobre a Parede Intestinal 22
Morfofisiologia Intestinal 23
Mucosa 25
Submucosa 28
Muscular 28
Serosa 28
Mesentério 29
Alterações morfológicas da mucosa intestinal 29
2.4.1 Nutrientes e adaptação intestinal 29
Caseínas 31
Proteínas da Soja 31

O Soro do Leite 32
2.5 Lactoferrina 32
2.5.1 Receptores de Membrana para a Lactoferrina 36
2.5.2 Proteólise da Lactoferrina no trato gastrintestinal 36
3 EXPERIMENTO I: Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas em coelhos 38
3.1 - MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1.1 Animais Experimentais 38
3.1.2 Solução de Lactoferrina do Soro de Leite Bovino 38
3.1.3 Procedimento Experimental 38
3.1.4 Tratamento do Material Coletado 39
3.1.4.1 Fixação 39
3.1.4.2 Inclusão em parafina 40
3.1.4.3 Microtomia 40
3.1.4.4 Colorações 40
3.1.4.4.1 Hematoxilina/Eosina e Tricrômio de Masson 40
3.1.4.4.2 Histoquímica por Picrosírius para colágeno 40
3.1.4.4.3 Imunohistoquímica Avidina-Biotina Peroxidase (ABP) 41
3.1.5 Análises Histológicas 42
3.1.5.1 Análises das Lâminas Histológicas (H.E e T.M) 42
3.1.5.2 Análise das lâminas da técnica de picrosírius para colágeno 44
3.1.5.3 Análise das lâminas de imunohistoquímica 45
3.1.5.3.1 Número e Área de Miofibroblastos 45
3.1.6 Morfometria das Feridas Cirúrgicas 46
3.1.7 Análise Estatística 47
4 EXPERIMENTO II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia induzida em intestino delgado de ratos 48
4.1 - MATERIAL E MÉTODOS II 48
4.2.1 Animais Experimentais 48
4.2.1.1 Recepção e adaptação dos animais 48
4.2.1.2 Pesagem dos animais 48
4.2.1.3 Identificação e isolamento dos animais 49
4.1.2 Dietas 49
4.1.2.1 Preparo das Rações 49
4.1.2.2 Mistura dos componentes 50
4.1.3 Procedimento Experimental 50
4.1.3.1 Procedimento Cirúrgico 51
4.1.3.2 Procedimento Pós Cirúrgico 51

4.1.4 Tratamento do Material Coletado 52
4.1.4.1 Fixação 52
4.1.4.2 Inclusão em parafina 53
4.1.4.3 Microtomia 53
4.1.4.4 Colorações 53
4.1.5 Análises das Lâminas 55
4.1.6 Análise estatística 56
5 EXPERIMENTO II – Parte 2: Estudo da Lactoferrina na cicatrização de enteroanastomose em intestino delgado de ratos 57
5.1 - MATERIAL E MÉTODOS III 57
5.1.1 Tratamento do Material Coletado 57
5.1.1.1 Colorações e Análises das Lâminas 57
5.1.2 Análise estatística 58
6 – RESULTADOS 59
6.1 Resultados do Experimento I - Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas, em coelhos 59
6.1.1 Resultados dos parâmetros histológicos quanto à intensidade: proliferação vascular; proliferação fibroblástica; colagenização; e reepitelização 59
6.1.1.1 Proliferação Vascular (PfVc) - Angiogênese 59
6.1.1.2 Proliferação fibroblástica (PfFb) - Fibroplasia 60
6.1.1.3 Colagenização (Clg) 61
6.1.1.4 Reepitelização (Rpt) 62
6.1.2 Resultados dos parâmetros histológicos quanto à: percentagem de células polimorfonucleares e células mononucleares 65
6.1.2.1 Células Polimorfonucleares (Pn) 65
6.1.2.2 Células Mononucleares (Mn) 66
6.1.2.3 Relação Polimorfonucleares versus Mononucleares 66
6.1.3 Resultados da Histoquímica (*picrosirius-red)* para Colágeno 68
6.1.3.1 Percentagem (%) da deposição do Colágeno tipo I (Cg-I) 68
6.1.3.2 Percentagem (%) da deposição do Colágeno tipo III (Cg-III) 69
6.1.3.3 Índice da Maturação do Colágeno (IMaC) 69
6.1.4 Resultados da Imunohistoquímica 71
6.1.4.1 Número de Miofibroblastos 71
6.1.4.2 Área dos Miofibroblastos 71
6.1.5 Resultado da morfometria das feridas cirúrgicas 72
6.1.5.1 Área das Feridas (mm^2) 72
6.1.5.2 Percentagem (%) de contração das feridas cirúrgicas 73
6.1.6 Análises de Regressão e Correlação 74

6.1.6.1 Intensidade de Colagenização vs Número de Miofibroblastos 75
6.1.6.2 Intensidade de Reepitelização vs Número de Miofibroblastos 75
6.1.6.3 Percentagem de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos 76
6.2 Resultados do Experimento II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia induzida em intestino delgado de ratos 76
6.2.1 Peso dos animais (g) 76
6.2.2 Histomorfometria da Mucosa Intestinal 78
6.2.2.1 Comprimento (Altura) das Vilosidades (CV) 78
6.2.2.2 Profundidade das Criptas (PC) 82
6.2.3 Avaliação dos Miofibroblastos da Pericripta Intestinal 84
6.2.3.1 Número de Miofibroblastos (NMf) 84
6.2.3.2Área dos Miofibroblastos (AMf) 87
6.2.4 Análises de Regressão e Correlação II 90
6.3 Resultados do Experimento II – Parte 2: Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de enteroanastomoses, em intestino delgado de ratos..... 93
6.3.1 Análise Histomorfológica e Histomorfométrica da Cicatrização das Enteranastomoses 93
6.3.1.1 Avaliação do número de células polimorfonucleares 94
6.3.1.2 Avaliação do número de células mononucleares 94
6.3.1.3 Avaliação do número de Miofibroblastos 95
6.3.1.4 Avaliação da Área (µm2) dos Miofibroblastos 96
6.3.1.5 Avaliação do número de vasos sanguíneos 96
6.3.1.6 Avaliação da percentagem (%) do Colágeno tipo I 97
6.3.1.7 Avaliação da percentagem (%) do Colágeno tipo III 98
6.3.1.8 Índice de Maturação do Colágeno (IMaC) 98
6.3.1.9 Colagenização (%) 99
6.3.2 Análises de Regressão e Correlação III 100
6.3.2.1 Número de Vasos Sanguíneos vs Número de Miofibroblastos 100
6.3.2.2 Deposição de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos 101
6.3.2.3 Deposição de Colágeno tipo III vs Número de Miofibroblastos 101
6.3.2.4 Colagenização vs Número de Miofibroblastos 102
7 DISCUSSÃO 103
7.1 Discussão do Experimento I: Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas em coelhos 103
7.1.1 Sobre a avaliação histológica por H.E. e T.M. 103
7.1.2 Sobre a deposição de Colágeno Tipo I e Tipo III e Índice de Maturação (IMaC) 105
7.1.3 Sobre o número e área dos Miofibroblastos 106

7.2 Discussão do Experimento II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia]induzida em intestino delgado de ratos 108
7.2.1 Sobre o peso dos animais 108
7.2.2 Sobre a Histomorfometria da mucosa intestinal 109
7.2.3 Sobre o número e área dos miofibroblastos da pericripta intestinal 111
7.3 Discussão do Experimento II – Parte 2: Estudo da Lactoferrina na cicatrização de anastomose em intestino delgado de ratos 114
7.4 Discussão das Análises de Regressão e Correlação 117
8 CONCLUSÃO 118
9 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 119

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Lactoferrina bovina (A) e humana (B) 34
Figura 2 - Ressecção de um retalho de pele 39
Figura 3 - As duas feridas cirúrgicas 39
Figura 4 - Fotomicrografia de lâmina do grupo FL corada por H.E 43
Figura 5 - Fotomicrografia de lâmina do grupo FL corada por Tricrômio de Masson 43
Figura 6 - Tela do Pixcavator com corte histológico corado pelo picrosírius 45
Figura 7 - Tela do ImageJ para mensuração da área do miofibroblasto 46
Figura 8 - Tela do ImageJ para mensuração da área da ferida 47
Figura 9 - Rato recebendo Lactoferrina por gavagem 50
Figura 10 - Animal anestesiado e preparado 52
Figura 11 - Laparotomia e exposição gastrintestinal 52
Figura 12 - Anastomose suturada 52
Figura 13 - Vilosidades e Criptas em Lâmina corada por H.E 54
Figura 14 - Miofibroblastos evidenciados pelo anticorpo primário anti-α-actina muscular lisa 54
Figura 15 - Vasos sanguíneos evidenciados pelo anticorpo primário anti-fator VIII 54
Figura 16 - Mensuração do comprimento da vilosidade com a ferramenta Straight Line do ImageJ 56
Figura 17 - Determinação da área do miofibroblasto da pericripta (corte transversal) com a ferramenta Freehand Selections no ImageJ 56
Figura 18 - Intensidade da Proliferação Vascular (iPfVc) 60
Figura 19 - Intensidade de Proliferação Fibroblástica (iPfFb) 61
Figura 20 - Intensidade de Colagenização (iClg) 62
Figura 21 - Intensidade de Reepitelização (iRpt) 63
Figura 22 - Fotomicrografia da Proliferação Vascular grupo FC 64
Figura 23 - Fotomicrografia da Proliferação Vascular grupo FL 64

Figura 24 - Fotomicrografia da Proliferação Fibroblástica grupo FC 64
Figura 24 - Fotomicrografia da Proliferação Fibroblástica grupo FL 64
Figura 26 - Fotomicrografia da Colagenização grupo FC 64
Figura 27 - Fotomicrografia da Colagenização grupo FC 64
Figura 28 - Fotomicrografia da Reepitelização grupo FL 65
Figura 29 - Percentagem de Polimorfonucleares (% Pn) 65
Figura 30 - Percentagem de Mononucleares (% Mn) 66
Figura 31 - Percentagem (%) de Polimorfonucleares (Pn) x Mononucleares (Mn) no grupo Controle (FC) 67
Figura 32 - Percentagem (%) de Polimorfonucleares (Pn) x Mononucleares (Mn) no grupo Controle (FL) 67
Figura 33 - Fotomicrografia de Polimorfonucleares do grupo FC…… 68
Figura 34 - Fotomicrografia de Mononucleares do grupo FL…… 68
Figura 35 - Percentagem (%) do Colágeno Tipo I (Cg-tI) 68
Figura 36 - Percentagem (%) de Colágeno Tipo III (Cg-tIII) 69
Figura 37 - Índice de Maturação do Colágeno (IMac) 70
Figura 38 - Colágenos tipo I (vermelho) I e tipo III (verde); Picrosirius-red 70
Figura 39 - Número de Miofibroblastos 71
Figura 40 - Área de Miofibroblastos 71
Figura 41 - Campo de lâmina do grupo FL com miofibroblastos; imunohistoquímica ... 72
Figura 42 - Áreas das Feridas (mm^2) 73
Figura 43 - Percentagem (%) de Contração das Feridas 74
Figura 44 - Intensidade de Colagenização vs Número de Miofibroblastos do grupo FL 75
Figura 45 - Intensidade de Reepitelização vs Número de Miofibroblastos do grupo FL 75
Figura 46 - Percentagem de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos do grupo FL 76
Figura 47 - Comparação do Peso (g) dos animais entre grupos: SL = Soja mais Lactoferrina ; CL = Caseína mais Lactoferrina 78
Figura 48 - Comparação do Peso (g) dos animais entre grupos: Si = Soja sem Lactoferrina ; Ci = Caseína sem Lactoferrina 78
Figura 49 - Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre Ci e Si 79
Figura 50 - Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre CL e SL..... 79
Figura 51 - Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre SL e Si 80
Figura 52 - Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre Ci e SL 80
Figura 53 - Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre Ci e CL 81
Figura 54 - Demarcação de vilosidade do grupo SL no software ImageJ 81
Figura 55 - Demarcação de vilosidade do grupo Si no software ImageJ 81
Figura 56 - Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e Si 82

Figura 57 - Comparação da profundidade das criptas (µm) entre SL e Si 83
Figura 58 - Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Cl e SL 83
Figura 59 - Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e CL 83
Figura 60 - Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e SL 84
Figura 61 - Comparação do número de Miofibroblastos entre Ci e Si 85
Figura 62 - Comparação do número de Miofibroblastos entre CL e SL 85
Figura 63 - Comparação do número de Miofibroblastos entre Ci e SL 86
Figura 64 - Comparação do número de Miofibroblastos entre SL e Si 86
Figura 65 - Comparação do número de Miofibroblastos entre Cl e Ci 87
Figura 66 - Comparação da Área (µm^2) entre Si e SL 88
Figura 67 - Comparação da Área (µm^2) entre Ci e SL 88
Figura 68 - Comparação da Área (µm^2) entre Ci e SL 88
Figura 69 - Comparação da Área (µm^2) entre SL e CL 89
Figura 70 - Comparação da Área (µm^2) entre Si e Ci 89
Figura 71 - Comprimento das Vilosidades vs Número de Miofibroblastos para CL 90
Figura 72 - Comprimento das Vilosidades vs Número de Miofibroblastos para SL 90
Figura 73 - Comprimento das Vilosidades vs Área de Miofibroblastos para CL 91
Figura 74 - Comprimento das Vilosidades vs Área de Miofibroblastos para SL 91
Figura 75 - Profundidade das Criptas vs Número de Miofibroblastos para CL 92
Figura 76 - Profundidade das Criptas vs Número de Miofibroblastos para SL 92
Figura 77 - Profundidade das Criptas vs Área de Miofibroblastos para CL 93
Figura 78 - Profundidade das Criptas vs Área de Miofibroblastos para SL 93
Figura 79 - Comparação dos números de Polimorfonucleares 94
Figura 80 - Comparação dos números de Mononucleares 95
Figura 81 - Comparação dos números de Miofibroblastos 96
Figura 82 - Comparação das áreas (µm^2) dos Miofibroblastos 96
Figura 83 - Comparação do número de vasos sanguíneos 97
Figura 84 - Comparação da percentagem (%) de Colágeno tipo I entre Ci e CL 98
Figura 85 - Comparação da percentagem (%) de Colágeno tipo III entre Ci e CL..... 98
Figura 86 - Comparação do índice de Maturação do Colágeno (IMaC) 99
Figura 87 - Comparação da Colagenização entre Ci e CL 99
Figura 88 - Número de Vasos Sanguíneos vs Número de Miofibroblastos em CL 100
Figura 89 - Percentagem de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos em CL 101
Figura 90 - Percentagem de Colágeno tipo III vs Número de Miofibroblastos em CL .. 101
Figura 91 - Percentagem de Colagenização vs Número de Miofibroblastos em CL 102
Figura 92 - Segmento de intestino seccionado, contendo a região de cicatrização da anastomose 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da proliferação vascular (Teste de Mann-Whitney) 60
Tabela 2 - Classificação da proliferação fibroblástica (Teste de Mann-Whitney) 61
Tabela 3 - Classificação da colagenização (Teste de Mann-Whitney) 62
Tabela 4 - Classificação da reepitelização (Teste de Mann-Whitney) 63
Tabela 5 - Intensidades dos parâmetros das lâminas coradas por H.E e T.M 63
Tabela 6 - Percentagem (%) de leucócitos observados no processo de reparação tecidual (ANOVA) 66
Tabela 7 - Relação entre as percentagens de polimorfonucleares e mononucleares ... 67
Tabela 8 - Percentagem (%) da deposição do colágeno tipo I, do tipo III e IMaC 70
Tabela 9 - Número e Área dos Miofibroblastos (Mfb) 72
Tabela 10 - Médias das áreas (mm^2) das feridas nos 10 dias 73
Tabela 11 - Médias das percentagens (%) das contrações das feridas nos 10 dias 74
Tabela 12 - Variação média dos pesos (g) 77
Tabela 13 - Variação média do comprimento das vilosidades (CV) em µm 81
Tabela 14 - Variação média da profundidade das criptas (PC) em µm 84
Tabela 15 - Variação média do número de miofibroblastos 87
Tabela 16 - Variação média das áreas (μm^2) dos miofibroblastos 89
Tabela 17 - Variação média entre os grupos, quanto ao número de células polimorfonucleares e mononucleares 95
Tabela 18 - Variação média entre os grupos, quanto ao número e área dos miofibroblastos (μm^2) e do número de vasos sanguíneos 97
Tabela 19 - Variação entre os grupos, quanto à percentagem (%) de deposição dos colágenos tipo I , tipo III e índice de maturação do colágeno (IMaC) 100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de H.E e T.M para o teste não-paramétrico de Mann-Whitney 59

APÊNDICES

Apêndice 1 - Organização dos dados da Intensidade da Vascularização para o teste de Mann-Whitney i
Apêndice 2 - Médias da leitura dos 3 cortes de cada lâmina, nas 3 observações para a avaliação da Intensidade da Proliferação Vascular i
Apêndice 3 - Organização dos dados da Intensidade da Proliferação Fibroblástica para o teste de Mann-Whitney ii
Apêndice 4 - Médias da leitura dos 3 cortes de cada lâmina, na avaliação da Proliferação Fibroblástica ii

Apêndice 5 - Organização dos dados da Colagenização para o teste de Mann-Whitney iii
Apêndice 6 - Médias da leitura dos 3 cortes de cada lâmina, na avaliação de Colagenização iii
Apêndice 7 - Organização dos dados da Reepetelização para o teste de Mann-Whitney iv
Apêndice 8 - Médias da leitura dos 3 cortes de cada lâmina, na avaliação da Reepitelização iv
Apêndice 9 - Média dos dados de Polimorfonucleares e Mononucleares v
Apêndice 10 - Médias da análise dos 3 campos para Deposição de Colágeno Tipo I, Colágeno Tipo III e do Índice de Maturação do Colágeno v
Apêndice 11 - Médias do número de miofibroblastos das três lâminas de cada ferida . vi
Apêndice 12 - Médias das áreas dos miofibroblastos das lâminas de cada ferida vii
Apêndice 13 - Médias dos pesos dos animais (g) viii
Apêndice 14 - Médias por animal, do comprimento das vilosidades em µm viii
Apêndice 15 - Médias das profundidades das criptas (PC) em µm viii
Apêndice 16 - Médias dos números de miofibroblastos ix
Apêndice 17 - Médias das áreas dos miofibroblastos (AMf) ix
Apêndice 18 - Médias dos números de células polimorfonucleares (CPn) ix
Apendice 19 - Médias dos números de células mononucleares (CMn) x
Apêndice 20 - Médias dos números de miofibroblastos (Mf) x
Apêndice 21 - Médias das áreas dos miofibroblastos (Mf) x
Apêndice 22 - Médias dos números de vasos sanguíneos (VSg) x
Apêndice 23 - Médias das intensidades de colágeno tipo I (Ct-I) xi
Apêndice 24 - Médias das intensidades de colágeno tipo III (Ct-III) xi
Apêndice 25 - Médias da deposição de colágeno total – Colagenização (Clg) xi
Apêndice 26 - Composição das Rações xii
Apêndice 27 - Componentes utilizados no preparo das rações xii

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentagem
® - Marca Registrada
Actina-α-sm - Alfa-Actina muscular lisa
ADP - adenosina difosfato
APUD – célula de captação e descaboxilação de aminas
bFGF – fator de crescimento fibroblástico básico
BMP - Proteína de Morfogênese Óssea
BTC - Betacelulina
Ci - Caseína sem Lactoferrina
CL - Caseína mais Lactoferrina
CMn - Célula Mononuclear
CPn - Célula Polimorfonuclear

CSF-1 – Fator Estimulador de Colônias
CTAP-III - Peptídeo III ativador de tecido conjuntivo
CTGF - Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
CV – Comprimento da Vilosidade
CXCR - Receptor CX de Quimosina
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DETC – células T epidérmicas dendríticas
ECM – Matriz Extracelular
EGF - Fator de Crescimento Epidermal
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ENA-78 - peptídeo-78, derivado de célula Epitelial, ativador de Neutrófilo
FBS - Soro Fetal Bovino
FC - Ferida Controle
FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGFR - receptor do fator de crescimento fibroblástico
FL - Ferida Lactoferrina (Ferida tratada com Lactoferrina)
GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
g - grama
GP IIb/IIIa - Glicoproteína IIb/IIIa
GRO-α - proteina alfa ligada a aumento da oncogenese
h - hora
HB-EGF - Fator de Crescimento Epidermal Ligado à Heparina
H.E.-Hematoxilina e Eosina
HER - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HGF - Fator de Crescimento de Hepatócitos
IGF - Fator de Crescimento semelhante a Insulina
IgG – Imunoglobulina G
IMaC - Índice da Maturação do Colágeno
IL – Interleucina
ISMF – miofibroblasto subepitelial intestinal
kDa – unidade de massa atômica
kg – kilograma
KGF – Fator de Crescimendo de Queratinócito
KSTI – fator Kunitz de inibição
L - litro
Lf – Lactoferrina
LFcin - Lactoferricina
Lp - Lactoperoxidase
M – Molaridade
MCP-1 – proteína quimioatraente de monócitos -1
m^2 - metro quadrado
mg - miligrama
min - minuto
mL - mililitro
mm - milímetro
mm^2 - milímetro ao quadrado
mM - milimolar
mol/L - mol por litro
NAP-2 - Peptídeo 2 Ativador de Neutrófilo
NGF - Fator de Crescimento Neural
ºC - graus Celsius
p - nível de significância estatística
PAF- Fator Ativador de Plaquetas
PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PG2 - Prostaglandina 2
pH - potencial de hidrogênio iônico
pI - ponto iso-elétrico

PLGF - Fator de Crescimento Placentário
PMN – Polimorfonuclear
REg – Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA - Ácido Ribonucléico
SCF – fator de célula tronco
SD - Desvio Padrão
SL - Soja mais Lactoferrina
Si - Soja sem Lactoferrina
TGF - Fator Transformador de Crescimento
TGFβ – Fator Transformador de Crescimento β
T.M. - Tricrômio de Masson
TNFα - Fator alfa de Necrose Tumoral
UF - ultra-filtração
VEGF - Fator de Crescimento Endotelial
VEGRF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular
vs. – versus
WPC - proteína concentrada do soro de leite
WP – Isolado Protéico do soro de leite
µg - micrograma
µL - microlitro
µmol - micromol
µmol/L - micromol por litro
µm - micrômetro
μm^2 - micrômetro ao quadrado

RESUMO

O propósito desse trabalho, dividido em dois experimentos, foi estudar os efeitos da Lactoferrina (Lf) em três situações de injúria tecidual. Todas as análises estatísticas consideraram nível de significância (alfa) $p \leq 0,05$. O **Experimento I** abordou a cicatrização de feridas cutâneas abertas, induzidas cirurgicamente. Utilizaram-se seis coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, machos, com seis semanas de idade. Realizaram-se na região dorsal, duas incisões na pele, com 10 mm de diâmetro. A cada 24 horas, uma ferida (FL) recebeu 1mL de Lf a 100µg/mL em solução salina e a outra (FC) somente solução salina. Fotografou-se diariamente para análise morfométrica. No décimo dia removeram-se retalhos do tecido de cicatrização para estudo histológico, histoquímico e imunohistoquímico dos elementos cicatriciais. Os resultados mostraram para FL maior: proliferação vascular ($p < 0,01$), fibroblástica ($p < 0,01$) e de mononucleares ($p < 0,001$); intensidade de colagenização ($p < 0,01$), reepitelização ($p < 0,01$), deposição de colágeno tipo I ($p < 0,01$); e melhor índice de Maturação (IMac) ($p < 0,01$). O número e área dos miofibroblastos foram maiores para FL com $p < 0,001$. A redução da área da ferida e percentagem de contração foram também favoráveis ao grupo FL ($p < 0,001$). **No Experimento II**, **partes 1 e 2** utilizaram-se 24 ratos Wistar, machos, com idade de 40 dias. Na primeira parte avaliou-se o papel da Lactoferrina na atrofia da mucosa intestinal induzida por Soja. Durante quinze dias, um grupo de seis animais (SL) recebeu ração "fonte protéica Soja" e uma vez ao dia, suplemento de Lf 200mg/kg por gavagem. Outro grupo (Si) recebeu a ração de Soja sem suplemento de Lf. Um terceiro grupo: (CL) recebeu ração "fonte protéica Caseína" mais a Lf e o último grupo (Ci) recebeu a ração Caseína sem a suplementação. No 16º dia foram submetidos à laparotomia mediana, um segmento da porção inicial do intestino delgado, com 10 mm, foi seccionado e efetuou-se anastomose termino-terminal. No seguimento seccionado efetuaram-se a morfometria das vilosidades e das criptas intestinais e a avaliação do número e tamanho dos miofibroblastos. No sétimo dia os animais foram sacrificados e se efetuou secção contendo a área da anastomose, para avaliação das características histológicas da cicatriz. **Na parte 1 do experimento** a comparação entre os grupos mostrou que o Comprimento das Vilosidades foi semelhante entre "CL e Ci" ($p > 0,05$) e maiores entre: "CL e SL" para CL ($p < 0,001$); "SL e Si", para SL ($p < 0,001$); "SL e Ci", para Ci ($p < 0,001$); e "Ci e Si", para Ci ($p < 0,001$). A Profundidade das Criptas foi semelhante entre "SL e CL", "SL e Ci" e "CL e Ci ($p > 0,05$) e foi maior entre "Si e Ci", para Si ($p < 0,001$) e "Si e SL", para Si ($p < 0,001$). O número de Miofibroblastos foi maior entre: "SL e CL", para SL; "SL e Si", para SL; "CL e Ci", para CL ; e "SL e Ci", para SL todos com $p < 0,001$; entre "Ci e Si" não houve diferença ($p > 0,05$). A Área dos Miofibroblastos foi: semelhantes entre os grupos "SL e CL' e "Si e Ci" ($p > 0,05$) e maiores entre: "SL e Si", para SL e "Cl e Ci", para CL ($p < 0,001$); e "SL e Ci", para SL ($p < 0,01$). **Na parte 2 do experimento**, na análise das enteranastomoses, utilizaram-se somente os grupos CL e Ci e a comparação mostrou: maior número de Polimorfonucleares para Ci ($p < 0,001$); de Mononucleares, Miofibroblastos e Vasos Sanguíneos, para o grupo CL, todos com $p < 0,001$.Também as áreas dos Miofibroblastos, percentagens de Colágeno tipo I, tipo III, IMaC e Colagenização foram maiores para o grupo CL, com $p < 0,001$. Por esses resultados, concluímos que a Lactoferrina estimula a proliferação de células e elementos vitais para a regeneração tecidual.

PALAVRAS-CHAVE: caseína, cicatrização, colágeno, criptas, enteranastomose, lactoferrina, miofibroblasto, pele, regeneração, soja, vilosidade intestinal.

ABSTRACT

The purpose of this work, divided into two experiments, was to study the effects of Lactoferrin (LF) in three situations of tissue injury. All statistical analysis found significance level (alpha) $p < 0.05$. **Experiment I** addressed the healing of open wounds, surgically induced. We used six species of rabbits Oryctolagus cuniculus, males, six weeks old. Performed in the dorsal region, two skin incisions, with 10mm diameter. Every 24 hours, a wound (FL) received 1 mL of the Lf 100µg/mL saline and the other (FC) only saline. Photographed daily to morphometric analysis. On the tenth day, flaps of the scar tissue were removed, for the histological, histochemical and immunohistochemical evidence of scarring. The results showed greater for FL: vascular proliferation ($p < 0.01$), fibroblastic ($p < 0.01$) and mononuclear ($p < 0.001$), intensity of collagen ($p < 0.01$), re-epithelialization ($p < 0,01$), deposition of collagen type I ($p < 0.01$), and better rate of maturation (iMac) ($p < 0.01$). The number and area of myofibroblasts were higher for FL with $p < 0.001$. The reduction of the wound area and percentage of contraction were also favorable to the FL group ($p < 0.001$). **In Experiment II, Parts 1 and 2**, we used 24 male Wistar rats aged 40 days. The first part evaluated the role of lactoferrin in intestinal mucosal atrophy induced by soybean. For fifteen days, a group of six animals (SL) received ration "soy protein source" and a once daily supplement of Lf 200mg/kg by gavage. Another group (Si) received a ration of soy without supplemental Lf. A third group (CL) received ration "casein protein source" over the LF and the last group (Ci) received the casein diet without supplementation. In the 16th day underwent a laparotomy, a segment of the initial portion of the small intestine, 10 mm, was sectioned and it was made terminus-terminal anastomosis. In the sectioned segment were conducted morphometry of the intestinal crypts and villi and the assessment of the number and size of myofibroblasts. On the seventh day the animals were sacrificed and made the section containing the anastomosis area, to evaluate the histological characteristics of the scar. **In Part 1 of the experiment** the comparison between groups showed that the length of the villi was similar between "Ci and CL“ ($p > 0.05$) and higher among between: "CL and SL" to CL ($p < 0.001$); "SL and Si" to SL ($p < 0.001$), "SL and Ci" to Ci ($p < 0.001$), and "Ci and Si" to Ci ($p < 0.001$). The crypt depth was similar for "SL and CL", "SL and Ci" and "Ci and CL” ($p > 0.05$) and was higher among "Si and Ci" to Si ($p < 0.001$) and "Si and SL" to Si ($p < 0.001$). The number of myofibroblasts was higher among "SL and CL" to SL, "SL and Si" to SL, "CL and Ci" to CL, and "SL and Ci" to SL all $p < 0.001$; between "Ci and Si" there was no difference ($p > 0.05$). The area of myofibroblasts was: similar between the groups 'SL and CL' and 'Si and Ci' ($p > 0.05$) and higher among "SL and Si," to SL and "Cl and Ci" to CL ($p < 0.001$), and "SL and Ci", to SL ($p < 0.01$). **In Part 2 of the experiment**, the analysis of enteranastomoses, we used only the Ci and CL groups and the comparison showed: increased number of polymorphonuclear for Ci ($p < 0.001$) and mononuclear cells, myofibroblasts and blood vessels, for the CL group, all $p < 0.001$. Also, the areas of myofibroblasts, percentage of collagen type I, III, iMac and collagen were higher for the CL group, $p < 0.001$. For these results, we conclude that Lactoferrin stimulates the proliferation of cells and vital elements for tissue regeneration.

KEYWORDS: casein, collagen, crypts, enteranastomosis, intestinal villi, lactoferrin, myofibroblast, regeneration, skin, soybean, wound healing.

1 - INTRODUÇÃO

Incontável é o número e a variabilidade de situações nas quais as superfícies corporais são submetidas às injúrias traumáticas, patológicas ou nutricionais. Na maioria dos casos, são lesões brandas, com pouca destruição tecidual, sendo desnecessário qualquer tipo de intervenção, pois os organismos vivos, na sua totalidade, apresentam excelente poder de auto-regeneração. Entretanto, há uma quantidade enorme de episódios, com grande extensão de destruição ou de alteração dos tecidos envolvidos, que implicam em perda funcional do órgão afetado e consequente sofrimento físico e emocional.

A reparação de uma injúria tecidual, não é um simples processo linear no qual fatores de crescimento disparam a proliferação celular e sim, a integração de processos interativos dinâmicos, que envolve mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). O estado nutricional tem, sem a menor dúvida, enorme influência nesses mecanismos, como relata FLANIGAN (1997) em seu estudo, onde mostra a intensa relação existente entre a deficiência de diferentes nutrientes e o surgimento da úlcera de decúbito em pacientes acamados, assim como a grande dificuldade na cura das mesmas.

A pele é sem dúvida a superfície mais propensa a lesões: acidentais, patológicas ou induzidas. Entretanto, assim como essa, as mucosas como a do aparelho digestório, estão por esses mesmos fatores, constantemente sujeitas às ações destrutivas e/ou alterações morfológicas.

Diversas patologias intestinais têm indicação cirúrgica como tratamento, com ressecção de segmento e conseqüente enteroanastomose. Nessas intervenções é freqüente o aparecimento de complicações e entre elas as deiscências são as piores, pois o extravasamento do conteúdo intestinal na cavidade peritoneal chega a gerar até mesmo septicemia e morte do paciente. Essas complicações podem ser oriundas de vários fatores, entre os quais: tipo de patologia, materiais e técnica cirúrgica, idade do paciente e sua condição nutricional (GILLESPIE, 1983; HENDRIKS e MASTBOOM, 1990; CONNEELY et al, 2004).

Fatores nutricionais podem ser diretamente responsáveis pela alteração do reparo tecidual, em seu tempo, intensidade e qualidade. A relação “intestino-nutriente” é comprovadamente uma relação de extrema complexidade e cumplicidade, onde se observa que até mesmo a simples presença ou ausência de nutrientes no lume intestinal pode induzir alterações, ou adaptações, tais como: atrofia ou hipertrofia da mucosa. Em estudo anterior, foi mostrado que ratos alimentados com concentrado de soja como única fonte protéica, apresentam acentuada atrofia da mucosa do intestino delgado, caracterizada por diminuição do comprimento e da área das vilosidades, assim como por aumento na profundidade das criptas intestinais (CARUSO e DEMONTE, 2005).

A unidade funcional básica do intestino é a “cripta-vilo”. Os enterócitos proliferam na cripta e migram em direção ao cume dos vilos onde são descartadas no final da sua vida útil. A taxa de reprodução das células na cripta e a proporção de migração desses enterócitos são alteradas em vários estados fisiológicos, patológicos ou por ação de diferentes substâncias (THOMSON e KEELAN, 1986).

Em muitas dessas situações, cutâneas ou intestinais, o alto grau de destruição requer tratamentos com aplicação de técnicas especializadas, quer sejam cirúrgicas, medicamentosas ou nutricionais, em grande parte com alto custo e demandando longo tempo de recuperação, tornando-as inacessíveis à grande parte da população. Portanto, é imprescindível a busca de novos elementos que auxiliem tanto na qualidade quanto no tempo da recuperação e que estejam ao alcance de qualquer pessoa. A Lactoferrina, glicoproteína pertencente à família da transferrina, tem mostrado propriedades que podem ser promissoras a esse papel.

Originalmente isolada do leite bovino, a Lactoferrina é encontrada também, em outras secreções exócrinas dos mamíferos e em grânulos específicos dos neutrófilos, os quais a liberam nos processos de inflamação. É bastante reconhecida por sua ação antimicrobiana e ainda por outras funções a ela atribuídas, entre as quais, a promoção do crescimento e diferenciação celular. Alguns trabalhos demonstram a participação da Lactoferrina na estimulação do crescimento de células epiteliais como: queratinócitos (CHEN et al., 2006), enterócitos em cultura Caco-2 (OGUCHI et al, 1995), epitélio do tecido

linfóide intestinal (SCHOTTSTEDT et al, 2005), células do estroma endometrial (YANAIHARA et al, 2000). Ações semelhantes são também demonstradas para células de origem mesodérmica como: osteoblasto (CORNISH et al, 2004; NAOT et al., 2005), célula linfoblástica T (ESAGUY et al, 1993) e ainda na angiogênese (NORRBY, 2004). Os mecanismos moleculares pelos quais a Lactoferrina atua a nível celular são, em grande parte desconhecidos, porém receptores específicos para ela foram descritos em diferentes tipos de células e tecidos de mamíferos, tais como: monócitos, linfócitos, plaquetas, hepatócitos, células epiteliais das glândulas mamárias e do intestino. (SUZUKI e LONNERDAL, 2002).

Os miofibroblastos, também de origem mesodérmica, localizados subjacentes à epiderme, assim como na periferia das criptas e na lâmina própria das vilosidades intestinais são fontes de vários fatores de crescimento celular, importantes nos processos de regeneração e cicatrização (FRITSCH et al, 2002). São células que expressam α-SMA (isoforma α da actina do músculo liso) e responsáveis pela produção de maior parte das proteínas da matriz extracelular. (DESMOULIÈRE et al, 2004).

1.1 - JUSTIFICATIVA

Baseando-se nesses experimentos que mostram, entre outras, a capacidade da Lactoferrina em estimular o crescimento de alguns tecidos de origem mesenquimal e epitelial, lançamos a hipótese que essa proteína possa exercer ações estimuladoras, também na proliferação e na atividade de células, tais como: endoteliais, macrófagos e miofibroblastos, que têm direta participação nos processos de regeneração tecidual.

Por haver similaridade da Lactoferrina humana com a bovina, optamos por utilizar essa última, pois o soro do leite bovino proveniente da produção de queijo contém razoável quantidade dessa e de outras importantes proteínas, mas é um resíduo indesejável ao meio ambiente. São geradas milhares de toneladas anualmente e, portanto, a possibilidade da Lactoferrina atuar favoravelmente nos processos de regeneração tecidual, faria dessa proteína um elemento de auxílio terapêutico bastante acessível, além da importância ambiental que representa o estimulo à sua extração e a outros compostos do “soro do queijo”, implicando em menor despejo do mesmo, nos afluentes.

1.2 – OBJETIVOS

Tendo em vista que os complexos mecanismos de regeneração tecidual podem estar sujeitos a interferências de diferentes fontes e situações, nossos objetivos foram estudar experimentalmente, sob os pontos de vista morfométrico e histológico, por técnicas convencionais, histoquímica e imunohistoquímica, a ação da Lactoferrina nas seguintes situações:

1 – No processo de cicatrização por segunda intenção, de feridas cutâneas provocadas cirurgicamente, em coelhos.

2 – Na atrofia do intestino delgado, induzida por dieta tendo concentrado de soja como única fonte protéica, em ratos.

3 – No processo de cicatrização cirúrgica de enteroanastomose, em ratos.

2- REVISÃO DA LITERATURA

A cicatrização de feridas e regeneração tecidual consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM et al., 2003).

A auto-regeneração nos seres vivos é uma capacidade universal. Nos organismos unicelulares, está restrita à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais, tais como: os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares e ainda, de moléculas com alta complexidade, como proteínas de elevada complexidade estrutural, RNAs e o DNA. Em organismos superiores, além destes, também ocorre o reparo de tecidos que pode se dar de duas formas: pela regeneração, com a recomposição da atividade funcional do tecido; e pela cicatrização, com restabelecimento da homeostasia do tecido, mas perda da sua atividade funcional devido à formação de cicatriz fibrótica (BALBINO et al, 2005). Se uma ferida não cicatriza ordenadamente ou se o processo de cicatrização não resulta em integridade estrutural, a ferida é considerada crônica (STADELMANN et al, 1998). A abordagem a uma ferida não curada é um desafio interdisciplinar que não deve ser subestimada (WITTE e BARBUL, 1997).

Qualquer que seja a natureza das lesões nos tecidos, imediatamente é iniciada uma cascata de eventos com a participação de células sensoriais, endoteliais, circulatórias e intersticiais, seja por estimulações químicas ou físicas, através de elementos estruturais das células lesadas, fragmentos inertes da matriz (colágenos, elastinas, fibronectinas), proteínas plasmáticas dos vasos rompidos e por reguladores inflamatórios pré-formados (STADELMANN et al, 1998). Como resposta, inicia-se a produção de uma segunda onda de mediadores eicosanóides, citocinas, fatores de crescimento e a externalização de proteínas de adesão para leucócitos, na superfície da membrana das células endoteliais, voltada para a luz dos vasos. Além disso, como decorrência do próprio trauma ou da ativação celular, o microambiente tem sua composição físico-química alterada (baixa tensão de O_2, diminuição

de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio) sendo essa, também uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular. Na continuidade do processo, ocorre no tecido lesado, infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e migração de células das áreas adjacentes como: queratinócitos e fibroblastos. Estas últimas, em cooperação com as células locais anteriormente ativadas, serão as protagonistas da fibroplasia e deposição de matriz extracelular. Terão participação também, na angiogênese e reepitelização da região da ferida. Os fatores de crescimento são os responsáveis pela recomposição do tecido regional ou restabelecimento da sua homeostasia, pela formação da cicatriz (BALBINO et al, 2005).

Em grande parte, os processos de cicatrização da pele e da parede intestinal são similares. Porém, devido às composições dos diferentes tecidos não serem exatamente iguais, existem algumas diferenças também nos processos de reparação. A força da cicatrização das suturas intestinais, por exemplo, é alcançada mais rapidamente do que nas da pele. O processo de cicatrização na anastomose intestinal inicia com acentuada reação inflamatória. Os neutrófilos aparecem por volta de 3 horas após a lesão. Mononucleares e fibroblastos após 24-48 horas. No intestino delgado, a reação inflamatória desaparece mais rapidamente do que na anastomose colônica (THORNTON e BARBUL, 1997).

2.1. Fatores de Crescimento

Fatores de crescimento são substâncias estimuladoras, por vezes inibidoras, que atuam nos processos de reparo e regeneração e definidos como “proteínas sinalizadoras extracelulares envolvidas na comunicação célula-célula”. São proteínas com grande especificidade, formadas por polipeptídios de pequeno tamanho. Podem ser classificados em três categorias: os que induzem a proliferação celular; os que estimulam a migração; e os que alteram o estado fenotípico da célula. São encontrados nos diferentes tecidos em fases de cicatrização, repovoamento ou renovação celular. A maioria dos fatores de crescimento age nas células-alvo vizinhas através da ligação a específicos receptores de membrana de alta afinidade. Ao se ligar ao receptor específico, induzem sinalização às vias de

transdução, levando à ativação de mecanismos efetores dentro da célula (ROBSON, 1991; PIERCE e MUSTOE,1995;; YORIO et al, 2007).

O primeiro fator de crescimento a ser isolado e estudado foi o Fator de Crescimento Neural (NGF) por Cohen e Levi-Montalcini em 1957, sendo seguido logo depois pela descoberta do fator de crescimento epidérmico (EGF), também por Cohen em 1965 (YORIO et al, 2007). A nomenclatura utilizada para os fatores de crescimento é complexa e bastante confusa. A grande maioria tem sido nomeada baseando-se nos seguintes ítens: no tipo de célula ou tecido do qual o fator foi isolado pela primeira vez (PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas); na resposta que provocou na célula-alvo ao se ligar no receptor (HGF - Fator de Crescimento de Hepatócito e FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto); ou a principal ação que estimulou (TGF – Fator de Crescimento Transformador) (YORIO et al, 2007). Alguns fatores apresentam atividades parecidas entre si. O Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo (CTGF), por exemplo, é um peptídeo rico em cisteína que apresenta atividades biológicas e imunológicas semelhantes ao PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) (IGARASHI et al, 1993).

Os Fatores de crescimento controlam a proliferação celular por uma série de reações bioquímicas com alta complexidade, as quais regulam a transcrição gênica e um sistema de controle na sua montagem e desmontagem. São descritas dezenas de proteínas atuantes como fatores de crescimento, liberadas por vários tipos celulares. Existe um receptor expresso na membrana de certas células, específico para determinado fator de crescimento. Os fatores de crescimento podem ser classificados em dois grupos: os de ampla especificidade, que influenciam diferentes variedades de células, como por exemplo, o PDGF (Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas) e o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) e os de estreita especificidade, que agem apenas em determinadas células. Em ambos os casos, esses fatores são produzidos, geralmente por células vizinhas à região afetada e atuam nos próprios locais. A cicatrização nos recém-nascidos, por exemplo, é mais eficiente, por terem níveis bastante elevados do Fator de Crescimento Neural (NGF), produzido pelas celulas das suas regiões lesadas. Esses fatores além de serem

responsáveis pela regulação do crescimento e da divisão celular estão também envolvidos em outras funções como: sobrevivência, diferenciação e migração celular (PIERCE e MUSTOE,1995; HASAN et al, 2000; COWIN et al, 2001; ROBSON, 2001; YORIO et al, 2007). As funções atribuidas ao KGF (Fator de Crescimento de Queratinócitos) vão muito além da pele. Em estudos de hibridização "*in situ*" o KGF têm sido encontrado em vários órgãos, nas zonas de interação mesenquima-epitelial, que instrumentam a organogênese. Nesses órgãos se incluem, o pulmão, glandulas mamárias e salivares, rins e a pele (GUO, DEGENSTEIN e FUCHS, 1996).

O colostro e o leite são grandes portadores de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Todos eles podem estar envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Sabe-se que são sintetizadas na glândula mamária e podem ser responsáveis pela regulação e diferenciação dos tecidos do recém-nascido como, do trato gastrintestinal, do sistema imunitário, entre outros. (BALLARD et al, 1998; RAYNER et al, 2000; POULIOT e GAUTHIER, 2006).

Aplicações de várias classes de fatores de crescimento têm demonstrado reforçar todos os aspectos da reparação de feridas incluindo inflamação, síntese matricial, redução da ferida, reepitelização e remodelação do tecido (RAYNER et al, 2000).

2.2 Processos Biológicos da Cicatrização e Regeneração Tecidual

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização. Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: inicialmente o estágio inflamatório, seguido pela proliferação e finalizando a reparação com o estágio de remodelação. Outros autores classificam de uma forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação; inflamação; proliferação; contração da ferida; remodelação. Em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente (MANDELBAUM et al, 2003).

Coagulação

Lesão tecidual causa ruptura dos vasos sanguíneos e hemorragia. As plaquetas aderem, agregam, e liberam vários mediadores para facilitar a coagulação. Apesar de hemostasia ser a função principal de coagulação do sangue, uma função secundária, mas igualmente importante das plaquetas é a de iniciar a cascata de eventos para a cicatrização, através de liberação de quimioatraentes e fatores de crescimento. Ao mesmo tempo, o coágulo fornece uma matriz de suporte para a migração de células à área lesada. Em resposta a esses importantes mediadores, leucócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos, iniltram-se na área da ferida e ajudam na limpeza e remoção dos restos de tecido danificado e partículas estranhas. Uma vez no local da ferida, os macrófagos ativados liberam importantes fatores de crescimento e citocinas, iniciando a formação do tecido de granulação (LI et al, 2007). Os principais constituintes do coágulo são a fibrina e as plaquetas. Estudos recentes têm demonstrado também a necessidade de fibrina para a migração celular apropriada e produção da matriz extracelular. A fibrina, por exemplo, participa na fase inflamatória através da ligação integrina, um receptor encontrado em monócitos e neutrófilos. A fibrina também serve como um repositório para vários fatores de crescimento e citocinas (BAUM e ARPEY, 2005). Após a ativação, as plaquetas sofrem adesão, bem como agregação e, ao mesmo tempo, liberam muitos mediadores (serotonina, adenosina difosfato e tromboxano A2) e proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina e fator de von Willebrand VIII). São liberados ainda: citocinas e fatores de crescimento, como Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator Transformador de Crescimento β (TGF-β), Fator de Ativação Plaquetária (PAF). PDGF é provavelmente o fator mais importante nesse período por ser o responsável pela direta e seqüencial migração dos neutrófilos, macrófagos e fibroblastos para a área lesada. (ROBSON, 1991; WITTE e BARBUL, 1997; LI et al, 2007).

Inflamação

Alterações vasculares "abrem as portas" entre os vasos sanguíneos e a ferida facilitando o extravasamento de proteínas séricas para o local da lesão. A nível celular, é um processo complexo e altamente controlado, que envolve o sistema nervoso, citocinas,

quimiocinas e fatores de crescimento. A vasodilatação capilar e o aumento da permeabilidade são estimulados por vários fatores e, em muitos casos, ambos os fenômenos são influenciados por um mesmo fator. O papel do sistema nervoso na inflamação é caracterizado pela vasodilatação e aumento da permeabilidade, que reagem a estímulos de células nervosas sensoriais. Os monócitos produzem um certo número de mediadores vasoativos, como a histamina e leucotrienos C4 e D4, que estimulam a vasodilatação A histamina, também por sua vez, indiretamente estimula a vasodilatação pelo aumento da produção de prostaglandinas. A trombina capilar não só participa da hemostasia através da ativação das plaquetas, mas também contribui para o processo inflamatório, estimulando o aumento da permeabilidade. Os Fatores de Complemento C3α e C5α estimulam a vasodilatação e agem como quimioatraentes para as células inflamatórias circulantes entrarem na ferida por diapedese (BAUM e ARPEY, 2005).

Algumas horas pós-lesão, a maior parte dos neutrófilos presentes na ferida transmigraram através da parede das células endoteliais dos capilares sanguíneos que foram ativados por citocinas pró-inflamatórias IL-1b e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) no local da ferida, levando a expressão de várias classes de moléculas de adesão, essencial para a adesão leucocitária e diapedese (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

Macrófagos, os próximos leucócitos a migrarem para a área lesada, são consideradas as mais importantes células reguladoras na reação inflamatória. Saem da corrente sanguínea como monócitos, atraídos para o local da ferida por alguns dos mesmos quimioatraentes para neutrófilos e seu recrutamento continua através de sinais liberados por quimioatraentes específicos para monócitos, como a Proteína Quimiotática de Monócitos. Produtos de degradação do colágeno, fragmentos de fibronectina e trombina são também quimioatraentes específicos para essas células. Os monócitos são ativados e diferenciam-se em macrófagos teciduais maduros. O processo de ativação é dirigido por mediadores presentes no microambiente e isso é crucial para a adaptação adequada da função dos macrófagos para as exigências metabólicas específicas do local da ferida. (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007; LI et al, 2007).

Macrófagos se ligam às proteínas específicas da matriz extracelular por seus receptores de integrina, uma ação que os estimula a fagocitar microorganismos e fragmentos de matriz extracelular. A adesão os induz, também, a expressar: o Fator Estimulador de Colônias 1 (CSF-1), citocina necessária para a sobrevivência dessas células; Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α), potente citocina inflamatória; e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), quimioatraente mitógeno para fibroblastos). Outras citocinas importantes sintetizadas por macrófagos são: Fator de Crescimento Transformandor (TGF-β); Interleucina-1; e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF). Além da ativação por ligantes, os macrófagos podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Nas regiões distais onde os vasos se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido em função da formação do trombo. Devido à grande afluência de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região, há aumento na demanda por oxigênio, com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH. Essa combinação de hipóxia com pH baixo e alta concentração de ácido láctico, também ativa o macrófago para a produção desses fatores de crescimento. São fatores certamente necessários para iniciar e propagar a formação de novos tecidos, uma vez que, animais com reduzido número de magrófagos, apresentam deficiência no reparo das feridas. Assim, essas células têm um papel central na transição entre a inflamação e reparação (SINGER e CLARK, 1999; BALBINO et al, 2005).

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que com suas linfocinas, substâncias liberadas ao entrarem em contato com antígenos específicos, têm importante influência sobre os macrófagos e, também a Interleucia-1 liberada, regula a colagenase, indicando o envolvimento de linfócitos com colágeno e remodelação da matriz extracelular (BATES e JONES, 2003; MANDELBAUM et al, 2003). O esgotamento total de todos os subconjuntos de linfócitos T resulta em cicatrização prejudicada e cada subconjunto parece contribuir na cicatrização por sua própria maneira. Evidências recentes têm demonstrado também, um papel importante para as células T epidérmicas dendríticas (DETCs) na cicatrização, por

produzirem o Fator de Crescimento de Fibroblastos-7 (FGF-7) que contribue para a proliferação dos queratinócitos (BAUM e ARPEY, 2005).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como: fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a vários tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização, facilitando a fagocitose de corpos estranhos e bactérias (BATES E JONES, 2003; MANDELBAUM et al, 2003).

Proliferação

As respostas inflamatórias à lesão fornecem o quadro necessário para a produção posterior de uma nova barreira funcional. Nesta fase de cura, a atividade celular é predominante. Os principais eventos durante esta fase são: o reforço do tecido lesado (fibroplasia), o estabelecimento de fornecimento de sangue adequado (angiogênese) e a criação de uma barreira de permeabilidade (reepitelização). A proliferação é responsável pelo "fechamento", propriamente dito, da lesão (LI et al, 2007).

Fibroplasia

Fibroplasia representa o processo de proliferação de fibroblastos, a migração destes no coágulo de fibrina, a produção de novo colágeno e outras proteínas da matriz, que contribuem para a formação do tecido de granulação (LI et al, 2007).

Como resposta precoce à lesão, sob influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, os fibroblastos nas bordas da ferida começam a proliferar e em cerca de quatro dias iniciam migração para a matriz provisória de coágulo, seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes. Com o aumento do número de fibroblastos, ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência, em paralelo, da formação de novos vasos

sangüíneos (neovascularização) na região. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz: elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelação fisiológica. Na sequência à proliferação fibroblástica, por volta do quarto dia, começa a se formar o tecido de granulação, inicialmente constituído pelos fibroblastos e macrófagos, seguidos por novos vasos em formação ou neoformados, todos amparados sobre uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e colágeno tipos I e II. Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exudativos e sangram com facilidade. Ao ser observado a olho nu, a superfície deste tecido parece conter muitos grânulos. Na verdade, estes nada mais são que as extremidades rombas de vasos neoformados que estão organizados perpendicularmente em direção à superfície e possuem uma coloração vermelha escura (MANDELBAUM et al, 2003; BALBINO et al, 2005).

A fibroplasia somente é possível porque uma vez que o fibroblasto tenha migrado para a ferida, vai mudando gradualmente a fenótipo profibrotico e sua principal função passa a ser a síntese protéica. Muitos fibroblastos também são diferenciados em miofibroblastos, participando de contração da ferida e na produção de importantes Fatores de Crescimento (LI et al, 2007).

Angiogênese

Angiogênese é o processo pelo qual os vasos sanguíneos danificados são substituídos por brotos de capilares intactos das proximidades do local da ferida. Alterações locais no ambiente tecidual, como aumento de lactato , diminuição do pH e da tensão de oxigênio, não só refletem uma perfusão tecidual inadequada, devido aos capilares danificados, mas também estimulam a angiogênese. Além disso, vários fatores de crescimento e citocinas produzidos durante a fase inflamatória da cicatrização, estimulam e regulam a angiogênese. Quatro fatores de crescimento importantes estão aí envolvidos: VEGF, FGF, angiopoietina e TGF-β. Esses fatores, aproximadamente no segundo dia pós-lesão, induzem as células endoteliais a migrar para a ferida ao longo da matriz extracelular (ECM) provisória, de uma forma semelhante ao que fazem os fibroblastos. Também são

liberadas as Interleucinas 1 a 6 (IL 1-6), que apresentam propriedades similares e são produzidas por diversos tipos celulares, de modo que diferentes fatores angiogênicos desenvolvem seu papel em diferentes etapas do processo de cicatrização. Além desses fatores solúveis, dois elementos estruturais têm provado ser fundamentais para a migração endotelial. Primeiro, deve haver a presença da matriz extracelular. Em segundo lugar, deve haver ausência de células endoteliais vizinhas (conhecido como o “efeito de borda livre”). Para células endoteliais poderem “navegar” pela ECM, devem expressar integrinas e matriz de metaloproteases (MMPs) (KNIGHTON et al, 1983; ROBSON, 1991; BATES e JONES, 2003; BAUM e ARPEY, 2005).

O sangue passa a fluir nessa nova rede capilar, proveniente da vascularização mais profunda. Com a diminuição da área lesada e a conseqüente regressão da demanda metabólica e ainda, a liberação de inibidores da angiogênese no local, a nova rede capilar passa por remodelação, deixando a cicatriz final pouco vascularizada (SINGER e CLARK, 1999).

Reepitelização

Reepitelização do ferimento é marca de sucesso no tratamento de feridas e representa uma seqüência de etapas que envolve a mobilização, migração, mitose e diferenciação celular. Células epiteliais imediatamente adjacentes à ferida são estimuladas a migrar, imediatamente após a perda da inibição por contato (STADELMANN et al, 1998).

A reepitelização das feridas começa em poucas horas após a lesão. Células epidérmicas de anexos da pele, como dos folículos pilosos, removem rapidamente o sangue coagulado e estroma danificado. Ao mesmo tempo as células sofrem alterações fenotípicas marcantes, que inclui retração de tonofilamentos intracelular, dissolução dos desmossomos que fornecem conexões físicas entre elas e formação periférica de filamentos de actina citoplasmática, que permitem sua movimentação. Além disso, as células epidérmicas e dérmicas não aderem umas às outras, devido à dissolução das ligações hemidesmossomicas entre a epiderme e a membrana basal, o que permite o movimento lateral das células epidérmicas. A expressão dos receptores de integrina em células epidérmicas lhes permite interagir com uma variedade de proteínas da matriz extracelular

(fibronectina, vitronectina) que são intercaladas com o Colágeno tipo I entrelaçado com o coágulo de fibrina, na área lesada (SINGER e CLARK, 1999).

Os principais responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio são os fatores de crescimento. Alguns dos fatores relacionados à angiogênese têm influência direta sobre as células de revestimento, como é o caso do Fator de Crescimento Endotelial Vascular-A (VEGF-A) e do Fator de Crescimento Derivado de Placenta (PLGF). A expressão desses apresenta-se também aumentada durante a migração de queratinócitos. Outros dois mediadores que participam da reconstrução epitelial, além de suas ações angiogênicas, são o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e o Fator Relacionado à Oncogene-α (GRO-α). O HGF foi inicialmente descoberto como um poderoso mitógeno de hepatócitos. Na região da ferida, este fator auxilia na recomposição celular e estimula a dissociação das células epiteliais (BALBINO et al, 2005).

Em experimentos *"in vitro"*, o GRO-α apresenta intensa atividade mitogênica para queratinócitos, sugerindo o seu envolvimento na reepitelização. Porém, acompanhando este efeito do GRO-α, foi observada redução significativa na contração da ferida. O efeito do TGF-β na reepitelização é aparentemente paradoxal. De um lado, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*", inibe a proliferação de queratinócitos, o que sugere ser este um regulador negativo da reepitelização e de outro lado, induz a expressão da integrina (proteína de adesão) que é fundamental para a migração destas células sobre a matriz provisória rica em fibronectina. Outros membros da família da superfamília TGF-β com participação na reepitelização são as ativinas (glicoproteina) e as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs). As ativinas A e B têm sua expressão fortemente induzida em diferentes áreas da ferida. A ativina pode estimular os fibroblastos para a expressão de fatores de crescimento, que paracrinamente estimula a proliferação dos queratinócitos. O BMP-6 acumula-se por toda a camada suprabasal da nova epiderme formada. Esta localização sugere sua participação na diferenciação de queratinócitos que os leva a cessarem sua atividade mitótica. A inibição da proliferação de queratinócitos parece ser necessária para o restabelecimento e total diferenciação da epiderme (HÜBNER et al, 1996; MANDELBAUM et al, 2003; BALBINO et al, 2005).

As ações da Interleucina 6 (IL-6) no processo de reparo não se restringem a seu efeito quimioatraente sobre os neutrófilos na fase inflamatória. A diversidade de células no foco da lesão que expressam IL-6 e seu receptor, somados à sua presença ao longo de toda a evolução da inflamação, sugere uma participação mais proeminente desta citocina no reparo. Demonstrou-se que a IL-6 exerce efeitos mitogênicos sobre os queratinócitos e que em camundongos geneticamente modificados suprimidos para IL-6, o processo de reparo evolui lentamente. Nestes experimentos, a administração tópica de IL-6 exógena reverte o processo e restabelece a reepitelização. O Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Macrófagos (GM-CSF) possui ação mitogênica sobre queratinócitos e também estimula a migração e proliferação de células endoteliais. Camundongos que superexpressam GM-CSF na epiderme apresentam reepitelização acelerada, resultante de aumento da proliferação de queratinócitos (MANN et al., 2001).

A leptina, hormônio secretado pelos adipócitos, quando administrada por via sistêmica ou tópica, acelera a reepitelização sem influenciar a angiogênese. A comprovação de que estes efeitos são mediados via receptor de leptina veio da ineficiência na reepitelização de feridas de camundongos diabéticos *db/db* geneticamente deficientes do seu receptor (RING et al., 2000).

A maioria dos membros da família dos FGFs possui um amplo espectro de ação mitogênica. Estes estimulam a proliferação de células de origem mesodérmica, ectodérmica, endodérmica e, ainda, de vários tipos de células presentes no tecido lesado, incluindo fibroblastos e queratinócitos (BALBINO et al, 2005). A família do fator de crescimento epidérmico (EGF) compreende as moléculas cujos efeitos sobre a reepitelização são mais estudados e característicos. Esta família é composta, além do próprio EGF, também pelo TGF-α, “EGF Semelhante à Heparina de Ligação” (HB-EGF), anfiregulina, epiregulina, betacelulina e epigen. Ficou evidenciado que o receptor de EGF influencia o reparo e a partir disso, uma série de estudos clínicos e experimentais demonstram efeito positivo do EGF, TGF-α e HB-EGF no reparo de feridas, sugerindo que endogenamente estes fatores estão envolvidos com o processo de cura das feridas. A ação do HB-EGF na proliferação de queratinócitos já foi demonstrada, assim como, a existência de sinergismo entre o HB-EGF

e o IGF I na proliferação de queratinócitos (BALBINO et al, 2005). É o EGF que contribui para o processo de reepitelização ativando as células epidermais, como visto anteriormente, a retrairem os tonofilamentos intracelulares, a dissolução dos desmossomos intercelulares, e a formação dos filamentos de actina, na periferia do interior da célula e consequentemente a migração em direção ao centro da ferida. As células migram sobre a matriz celular provisória e durante sua trajetória, seguem depositando quantidades apreciáveis de fibronectina. A superfície da ferida umedecida e oxigenada é um fator que acelera o processo de migração. Quando estas células encontram uma crosta recobrindo a região lesada, promovem uma dissecação entre esta e a matriz, porém, à custa de um retardo de velocidade de migração. À medida que a região da lesão vai sendo coberta pelas células epidermais é acionado o mecanismo de "inibição por contato". As células voltam a apresentar o fenótipo original, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos (WITTE e BARBUL, 1997; STADELMANN et al, 1998; BALBINO et al, 2005).

Contração da Ferida

É o movimento centrípeto das bordas da ferida de espessura total. As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração que diminuem em 20% o seu tamanho mesmo quando há enxertos. Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo (MANDELBAUM et al, 2003). Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos exibindo características funcionais similares às células do músculo liso (BALBINO et al, 2005). Os miofibroblastos fazem ligação intercelular por desmossomos e mácula de adesão. Aderem-se entre si e às bordas da lesão, fazendo a contração de todo o leito granular e aproximando as margens da ferida (WITTE E BARBUL, 1997; STADELMANN et al, 1998).

O avanço das bordas da ferida aumenta à medida que se intensifica a taxa de mitose e continua a cobrir a área lesada até que se encontram. Neste ponto a migração celular cessa, devido ao fenômeno da inibição por contato (STADELMANN et al, 1998).

Miofibroblastos

Os miofibroblastos foram definidos como células altamente diferenciadas contendo organelas especializadas e que apresentam características comuns a fibras musculares e fibroblastos. Estão presentes fisiologicamente no tecido conjuntivo em pequenas populações de quase todos os órgãos, particularmente em locais onde a força mecânica é necessária (DESMOULIÈRE et al., 2004). Essas células pertencem a uma classe única, e mesmo tendo em conta as funções específicas para as células em um determinado órgão ou tecido, há uma semelhança surpreendente em sua morfologia, função e repertório bioquímico, independentemente da sua localização. No entanto, em um dado tecido, elas podem expressar algumas aparências e funções específicas, ou seja, heterogeneidade fenotípica e funcional (POWELL et al, 1999).

Miofibroblastos podem se originar de células-tronco progenitoras na crista neural e alternativamente, podem simplesmente transdiferenciar de fibroblastos residentes em tecidos tais como: vascular, intestinal ou uterino. Fator Transformador do Crescimento beta (TGF-β) parece ser a chave neste processo de transdiferenciação. A ativação de um fibroblasto a expressar o fenótipo de célula muscular lisa, pode exigir tanto TGF-β como uma interação específica, célula-matriz (POWELL et al, 1999). BRITTAN et al (2002), mostraram evidências de que células adultas de medula óssea, podem se diferenciar em miofibroblastos da pericripta intestinal, tanto em ratos como em seres humanos, citando que a descoberta representa um novo caminho de terapia genética para o intestino, pela qual enxertos de células mais profundas da mucosa podem ser feitos.

Estruturalmente os miofibroblastos apresentam três elementos morfológicos essenciais: feixes de actina paralelos ao maior eixo da célula; sítios de ligação célula-estroma; e espaços para ligação intracelular. Essas células têm sua ativação intermediada por citocinas PDGF e FGF, assim como por interleucina. São importantes produtoras de colágeno dos tipos I e III, e existe correlação direta, entre o nível do principal marcador

destas células, a “actina α-sm” e o grau de contração dos miofibroblastos. Apesar de seu mecanismo contrátil não estar bem esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão (SCHURCH, SEEMAYER E GABBIANI, 1998; HINZ et al. 2001; LORENA et al. 2002). Em geral, existem várias atividades normais, comuns dos miofibroblastos. São componentes essenciais de organogênese ou morfogênese, através de interações mesenquimais e epiteliais. Isso é feito através da secreção de mediadores da inflamação, fatores de crescimento e expressão de seus receptores, e ainda, através da secreção e formação de matriz intersticial e/ou moléculas da membrana basal. Eles desempenham um papel fundamental na cicatrização de feridas, presumivelmente como uma extensão ou acentuação do seu papel no crescimento normal e diferenciação. Eles parecem estar envolvidos na formação e reparação da matriz extracelular, proliferação e diferenciação das células epiteliais, vasculares e elementos neurogênicos (POWELL et al, 1999).

Os miofibroblastos podem receber, regular e transmitir sinais imunes derivados de células epiteliais adjacentes (HINTERLEITNER et al, 1996). Já foram demonstrados vários fatores produzidos e secretados pelos miofibrobastos, como citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios. Entre outros são citados por POWELL et al (1999): IL (interleucina); TNF-α (fator de necrose tumoral-α); TGF-β (fator de crescimento transformador-β); MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1); CSF-1 (fator estimulante de colônias-1); GM-CSF (fator estimulante de colônias granulócitos / macrófagos); PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas); bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico); IGF (fator de crescimento semelhante a insulina); NGF (fator de crescimento neural); KGF (fator de crescimento de queratinócitos), HGF (fator de crescimento dos hepatócitos); SCF (fator de célula-tronco); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); PAF (fator de ativação plaquetária). Alterações na proliferação celular e da atividade biossintética após relaxamento de tensão na ferida, demonstram ser o possível mecanismo do desaparecimento da maioria dos miofibroblastos na fase final da cura. Porém, enquanto o tecido está sob estresse mecânico celular, as atividades de proliferação e de biossíntese persistirão (GRINNEL, 1994).

Remodelação

Essa é a última das fases; ocorre no colágeno e na matriz. É responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos para a conexão, a qual aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. Como citado anteriormente, a neovascularização regride e a cicatriz passa a ser considerada praticamente avascular. Uma cicatrização normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (MANDELBAUM et al, 2003).

Remodelação consiste na deposição da matriz e suas alterações posteriores ao longo do tempo. Ela ocorre durante todo o processo de reparo. A fibrina do coágulo formado na fase inicial inflamatória é substituído pelo tecido de granulação que é rica em colágeno tipo III e vasos sanguíneos durante a fase proliferativa e, posteriormente, substituído pelo colágeno tipo I, predominantemente na cicatriz. Uma das características da remodelação da ferida é a alteração da composição da matriz extracelular. Em adultos saudáveis, o tipo I representa cerca de 80% do colágeno na derme (LI et al, 2007).

O processo de remodelação da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subseqüentemente digeridas pela colagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente unidas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência, devido à organização das fibras acompanhando a direção das forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal (BALBINO et al, 2005).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e têm demonstrado um papel na cicatrização de feridas através da produção de TGF-β. Este fator de crescimento

contribui para a reepitelização na proliferação de queratinócitos. A necessidade de eosinófilos na cicatrização de feridas, no entanto, não é completamente compreendido (BAUM e ARPEY, 2005).

2.3 - O Colágeno

No aspecto funcional, o colágeno é o componente mais importante na reparação de qualquer que seja o tipo de tecido lesado (THORNTON E BARBUL, 1997). O colágeno é composto de três cadeias de polipepitídeos. Na sua produção ocorre a hidroxilização dos aminoácidos prolina ou lisina. Este processo é essencial, pois confere estabilidade à molécula do colágeno. Clinicamente é a fase mais importante, pois a quantidade e a qualidade desta proteína determinarão a força mecânica do tecido remodelado (DIEGELMANN, ROTHKOPF e COHEN, 1975; WITTE E BARBULL, 1997).

Existem mais de duas dezenas de tipos de colágenos já descritos. Em condições normais os fibroblastos, como já citado, produzem o colágeno tipo I, que é o mais comum e perfaz aproximadamente 80% desta proteína no corpo dos mamíferos. O colágeno tipo III, freqüentemente encontra-se associado ao primeiro. A proteína colágena representa 30% do total de proteínas presentes no organismo humano (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Nos processos de cicatrização e restauração, os miofibroblastos passam a ser os principais produtores dos colágenos, principalmente o tipo I, tendo importante papel na síntese e reorganização da matriz extracelular (ECM) que resulta na sua geração de força (TOMASEK et al, 2002). O colágeno tipo III deposita-se inicialmente no tecido de cicatrização e caracteriza-se por ser proteína imatura; mais tardiamente, com a remodelação, surge o tipo I, de características maduras. Nesta fase final da cicatrização ocorre a maturação do tecido de reparação, que progride gradualmente de estado altamente celular e vascularizado até a formação da cicatriz, com poucos vasos sanguíneos e células e tendo como resultado final, um tecido resistente com fibras colágenas apresentando alto grau de orientação (GAFFNEY et al, 2002). O colágeno derivado do tecido de granulação difere do colágeno do tecido intacto, pois apresenta maior hidroxilização e glicosilação, o que confere ao primeiro, diâmetro maior, assim como a organização paralela ao tecido

vizinho das fibras colágenas, não corresponde à organização dos tecidos intactos, que demonstram padrão de “cesto trançado” (FORREST, 1983). Ainda, a deposição do colágeno do tipo III na ferida inicia-se precocemente, atinge seu pico em torno do terceiro dia e reduz-se progressivamente até o sétimo dia. A presença de colágeno do tipo I aumenta progressivamente após o segundo dia, por pelo menos de quatro a cinco semanas (EHRLICH e KRUMMEL, 1996). Para que ocorra boa cicatrização é necessário que exista equilíbrio entre a formação e degradação do colágeno. Sua destruição é mediada pela enzima colagenase, que por sua vez é regulada por citocinas (WITTE e BARBUL, 1997).

Na anastomose intestinal, a submucosa é extremamente importante, pois é a camada que possui a maior concentração de colágeno e, portanto, fornece sustentação à parede intestinal. Nos primeiros dias após a injúria, o colágeno é degradado secundariamente à atividade de colagenase na região da lesão. A força na faixa da anastomose é dependente da capacidade da ancoragem da sutura até que o novo colágeno seja sintetizado pelos miofibroblastos (THOMPSON et al, 2006). A resistência mecânica da anastomose intestinal é determinada pela proporção presente entre colágeno imaturo pouco entrelaçado e colágeno maduro bastante entrelaçado. Ou seja, a quantidade tanto como a qualidade do colágeno, com suas características de entrelaçamento, confere maior ou menor resistência (KORUDA e ROLANDELLI,1990).

2.4 Considerações sobre a Parede Intestinal

Responsável pelos atos finais da digestão, solubilização e absorção da maior parte dos nutrientes ingeridos, o intestino delgado apresenta-se, assim como todo o tubo digestório, com quatro túnicas características. Entretanto sua mucosa e submucosa são extremamente diferenciadas em vários níveis de organização e adaptação para aumentar a área superficial da luz (ou lume) intestinal, através das chamadas pregas circulares, as quais são dobras da mucosa e submucosa (válvulas de Kerkring), também através das evaginações digitiformes da mucosa que se projetam para a luz, chamadas de vilosidades intestinais ou vilos e do epitélio simples da mucosa, com células prismáticas absortivas (enterócitos) que constituem a borda estriada, assim chamada pela característica conferida

pelas microvilosidades da região apical da célula (ROSS et al,1993; GEORGE e CAstro,1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; GLEREAN, 2002).

Morfofisiologia Intestinal

Anatomicamente o Intestino Delgado aparece como um longo tubo enovelado e subdividido em 3 porções distintas: duodeno, jejuno e íleo. Continua a solubilização e a digestão do quimo proveniente do estômago e a sua subseqüente absorção (ROSS et al, 1993). A maioria dos nutrientes é absorvida no intestino delgado e vem daí a grande importância de estudos interdisciplinares. Como visto, a mucosa e a submucosa são bastante modificadas na sua organização para aumentar principalmente a superfície de absorção. As pregas circulares contêm uma porção central de submucosa que se projeta para dentro da luz do órgão e está revestida por mucosa (ROSS et al, 1993; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os vilos apresentam um revestimento epitelial e uma lâmina própria subjacente. O centro de cada vilo contém um capilar linfático (vaso quilífero central) que se inicia em “fundo cego” e drena para vasos linfáticos maiores situados na submucosa. Quando está ocorrendo absorção, os vasos quilíferos se dilatam e ficam facilmente visíveis em cortes histológicos corados por Hematoxilina/Eosina (H.E). Em outras condições ficam colabados e assim, praticamente invisíveis (ROSS et al, 1993). O eixo cripta-vilo é a principal unidade anatômica e funcional do epitélio do intestino delgado. As células-tronco nas criptas de Lieberkuhn dão origem a células filhas que diferenciam em quatro tipos de células epiteliais: enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e células de Paneth. Nas lesões do intestino, tais como: isquemia, irradiação, trauma e ressecções do intestino delgado ou durante a recuperação de doenças inflamatórias, como a doença de Crohn, a renovação rápida do epitélio é necessária para manter o intestino funcional e um estado nutricional adequado (THOMSON e KEELAN, 1996).

Um programa de regulação genética dentro do intestino produz um desenvolvimento na diferenciação celular em todo o comprimento do eixo das criptas em direção aos vilos. Células tronco são codificadas com um endereço posicional específico o que possibilita uma apropriada diferenciação espacial em todo o comprimento da cripta, na

direção ao vilo e no eixo do duodeno em direção ao colo intestinal. Esse dado pode ser intrínseco para a célula tronco ou programado para interações de componentes endodérmicos com o estroma ou com o mesênquima. As alterações na dinâmica das células basicamente impõem, onde ao longo do vilos, os enterócitos com duração específica expressarão atividade transportadora. Dessa maneira o poder de absorção muda conforme o resultado da alteração no número de enterócitos transportando e não somente como o resultado da variação do total da área de superfície da mucosa (THOMSON E KEELAN, 1996).

Interações epitélio-mesenquimais são críticas para a morfogênese normal e manutenção das unidades cripta-vilo. O mesênquima é necessário para o crescimento normal e diferenciação da endoderme. Por exemplo: a diferenciação "*in vitro*" de endoderme em enterócitos ocorre somente na presença de fibroblastos ou células mesenquimais. Em algumas circunstâncias, o mesênquima dirige especificidade regional no intestino. Por exemplo: mesênquima do intestino delgado pode instruir endoderme heteróloga para expressar um fenótipo de intestino delgado. As moléculas que regulam essas interações recíprocas ainda estão sendo elucidadas. O mesênquima do intestino se diferencia em componentes do tecido conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, fibroblastos e músculo liso. Os miofibroblastos subepiteliais, em especial, desempenham um papel importante na ontogênese, tanto no intestino fetal como no intestino de adultos. Localizados na periferia das criptas e na lâmina própria da vilosidade, estas células são necessárias para a reparação do epitélio intestinal. Eles são fonte de fatores de crescimento como o Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (bFGF) e o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) bem como proteínas para a membrana basal (POWELL et al, 1999; FRITSCH, et al, 2002). Os miofibroblastos subepiteliais intestinais (ISEMFs) são encontrados na lâmina própria do intestino sob as células epiteliais e acredita-se existir uma espécie de sincício entre eles. Miofibroblastos estão dispostos numa bainha fenestrada, em estreita aposição com as criptas intestinais e se estendem até a lâmina própria para se juntar aos pericitos dos vasos sanguíneos (FRITSCH et al, 2002).

Pericito é uma célula mesenquimal, associada com as paredes de vasos sanguíneos pequenos. Como é uma célula relativamente indiferenciada, serve como suporte para estes vasos, mas pode se diferenciar em um fibroblasto, célula de músculo liso ou macrófago conforme a necessidade. Participam no processo de reparação de tecidos dos vasos sanguíneos, sendo também que a presença de miosina, actina e tropomiosina nos pericitos sugere fortemente que estas células também tenham uma função contrátil, responsável por auxiliar na regulação do fluxo sanguíneo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Miofibroblastos subepiteliais intestinais aparecem no embrião humano, na vigésima primeira semana de gestação, e tem sido sugerido que sua origem pode ser a partir da crista neural, ou localmente a partir de células tronco mesenquimais, possivelmente localizadas na mucosa e na muscular. Há algumas evidências de que ISEMFs, assim como as células epiteliais, proliferam e migram lateralmente à cripta, ao longo da vilosidade, diferenciando-se a partir de uma forma discóide na base da cripta, para uma forma estrelada no ápice e ali sofrem apoptose. Outros estudos indicam que migram lentamente ao lado da cripta, e então se dirigem para fora. A maioria dos pesquisadores concorda que miofibroblastos subepiteliais são de fundamental importância nas interações epitélio mesenquimais e que há significativas informações parácrinas cruzadas, durante a diferenciação epitelial. Por exemplo, vários fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF) e o Fator Transformador do Crescimento beta (TGF-β), são secretados pelos miofibroblastos, com receptores específicos localizados em células epiteliais. Células da medula óssea, podem se diferenciar em miofibroblastos da pericripta em ratos e em seres humanos (POWELL et al, 1999; FRITSCH, et al, 2002).

Mucosa

A mucosa é revestida por epitélio cilíndrico simples, “apoiado” sobre a lâmina própria a qual contém grande quantidade de células do sistema imunológico (*tecido linfático difuso*) e as células fixas do tecido conjuntivo. As glândulas intestinais (ou criptas de Lieberkühn), que aparecem em toda a sua extensão, são glândulas tubulares simples e se estendem por toda a espessura da mucosa, abrindo-se para a luz intestinal na base dos

vilos. Ainda, por todo o intestino delgado, a mucosa contém inúmeros nódulos isolados de tecido linfóide. No íleo esses nódulos aparecem em agregados formando as placas de Peyer (ROSS et al, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Pelo menos cinco tipos celulares são encontrados no epitélio intestinal: enterócitos, células caliciformes, células de captação e descarboxilação de aminas precursoras (APUD), células de Paneth e células indiferenciadas. Outro tipo celular, a *célula M*, pode ser encontrado na superfície dos nódulos linfáticos e estão relacionadas às funções imunológicas do tubo digestivo. Pode-se encontrar ainda, linfócitos na camada epitelial. (ROSS et al, 1993). Enterócitos, também conhecidos como “células absortivas”, são células epiteliais cilíndricas altas, com núcleos basais. Contém números microvilos paralelos na região apical, formando a “borda estriada” (ou borda em escova) da microscopia óptica. Esta, ao microscópio eletrônico, se apresenta como uma camada delgada com cerca de 3000 microvilosidades por célula, o que aumenta em muito a área de absorção das mesmas e cuja membrana e suas vesículas estão envolvidas nos processos de digestão e absorção dos três principais nutrientes: proteínas, carboidratos e lipídeos. Em geral, o número e a forma dos microvilos, em determinado tipo celular têm relação com a sua capacidade de absorção (ROSS et al, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os enterócitos estão organizados de tal forma que podem atuar no transporte de líquidos. Estão unidos entre si nos pólos apicais, por “complexos juncionais”, os quais compreendem junções de oclusão que separam a luz intestinal do espaço intercelular lateral. Este espaço na porção basal às vezes está dilatado, principalmente durante o transporte de líquidos. A membrana basolateral que margeia o espaço intercelular contém ATPases relacionadas ao transporte de sódio para o espaço intercelular. O aumento da concentração de sódio, assim criado no espaço intercelular, retira a água da célula por osmose. Quando o espaço intercelular é mínimo, os enterócitos adjacentes apresentam *pregas* interdigitantes de suas membranas celulares. Embora as funções absortivas dos enterócitos sejam conhecidas há muito tempo, sabe-se atualmente que eles também sintetizam enzimas digestivas, algumas das quais atuam na própria membrana da borda estriada (THOMSON e KEELAN,1986; ROSS et al,1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A membrana celular dos microvilos da borda estriada participa da absorção e digestão. As enzimas digestivas estão aderidas à membrana celular e seus grupos funcionais estendem-se para o exterior, para formarem parte do glicocálix. Deve-se observar que com esta disposição, os produtos finais da digestão estão próximos do seu local de absorção. Entre essas enzimas estão: peptidases e dissacaridases. Essa membrana também contém a enzima enteropeptidase (enteroquinase), particularmente importante no duodeno onde converte tripsinogênio em tripsina. O enterócito também desempenha um importante papel no catabolismo da glutamina arterial e de aminoácidos da dieta (ROSS et al, 1993).

As “células caliciformes”, localizadas entre as demais células do epitélio intestinal, são células glandulares polarizadas do tipo mucoso, que secretam muco, constituido por proteínas intensamente hidrofílicas (ROSS et al, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). As “Células de Paneth” localizadas na porção mais profunda das glândulas intestinais têm características ultra-estruturais de células que sintetizam e secretam proteínas, ou seja: grande quantidade de REg bem organizados no citoplasma basal e no citoplasma apical, um aparelho de Golgi bem desenvolvido, além de grandes grânulos eosinófilos contendo lisozima. Essas células também são fagócitos para alguns tipos de bactérias o que leva a crer que junto com a ação da lisozima, as *células de Paneth* servem para regular a flora microbiana do intestino. São encontradas em: humanos, macacos e alguns roedores, mas não em coelhos, suínos e gatos (THOMSON e KEELAN, 1986; ROSS et al, 1993).

Células APUD (Amine Precursor Uptake and Descarboxylation): são células de captação e descarboxilação de aminas precursoras. Têm sido descritos vários tipos de células APUD; todas possuem númerosos grânulos de secreção que são eliminados na direção do tecido conjuntivo. Estão localizadas na porção basal do epitélio. São fontes de substâncias parácrinas e prováveis hormônios. Algumas se estendem até à luz onde apresentam microvilosidades, talvez para coletar amostras do conteúdo intestinal (ROSS et al, 1993).

Submucosa

É constituída por tecido conjuntivo de densidade variável, tendendo a frouxo. Contém os vasos sangüíneos mais calibrosos do tubo digestório, sendo que estes enviam seus ramos para a mucosa, túnica muscular e serosa. Também contém vasos linfáticos e plexos nervosos. As redes nervosas são constituídas por fibras sensoriais, fibras simpáticas e parassimpáticas do sistema nervoso autônomo. Entremeados por toda a rede nervosa estão os corpos dos neurônios parassimpáticos ganglionares. A rede submucosa de fibras nervosas não mielinizadas e das células ganglionares, constituem o plexo submucoso de Meissner (ROSS et al, 1993; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A submucosa do duodeno contém glândulas túbulo-alveolares ramificadas, produtoras de muco, conhecidas como "Glândulas de Brunner". Sua secreção é eliminada através de ductos no fundo das criptas intestinais. A secreção é alcalina, rica em bicarbonato e bastante viscosa, características que sugerem uma função protetora contra o quimo ácido proveniente do estômago (ROSS et al, 1993).

Muscular

É constituída por uma camada interna de fibras lisas com disposição circular e outra externa longitudinal. Assim como a submucosa, essa túnica contém redes de fibras nervosas e de células ganglionares que constituem o "plexo mioentérico de Auerbach", que na muscular, os seus principais componentes ficam localizados entre as duas camadas de fibras musculares. Ocorrem dois tipos de contrações: as contrações locais e o peristaltismo. As locais deslocam o conteúdo intestinal, no sentido proximal e distal e são denominadas de "movimentos de segmentação". Servem para fazer o quimo circular no local, misturando-o com os sucos digestivos e colocando-o em contato com a mucosa, para permitir a absorção. O peristaltismo movimenta o conteúdo para a região distal (ROSS et al, 1993; GEORGE e CASTRO, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Serosa

É uma membrana constituída por uma só camada de células epiteliais pavimentosas (mesotélio) e por pequena quantidade de tecido conjuntivo subjacente. As células epiteliais contem microvilos na sua superfície livre (ROSS et al, 1993).

Mesentério

Do ponto de vista histológico, é uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, freqüentemente com númerosos adipócitos. Através dele correm nervos e ainda vasos sangüíneos e linfáticos que irrigam e drenam o tubo digestivo (ROSS et al, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Alterações morfológicas da mucosa intestinal

A etiologia das alterações na mucosa intestinal é muito complexa, sendo discutidos vários fatores, dentre os quais podemos destacar a composição da dieta e a qualidade dos elementos empregados na sua formulação.

Existem duas dramáticas transições no desenvolvimento que estão associadas com mudanças na demanda funcional no trato gastrintestinal. A primeira ocorre no nascimento quando a nutrição placentária é abruptamente interrompida e o trato gastrintestinal é obrigado a assumir, sozinho, a responsabilidade de extrair nutrientes do lume intestinal. A segunda transição ocorre com o desmame, quando alimentos sólidos tornam-se as principais fontes de nutrientes (THOMSON e KEELAN, 1996). As alterações histopatológicas da mucosa observadas, por exemplo, em suínos, estão relacionadas à imaturidade dos enterócitos, à diminuição da altura das vilosidades, aos aumentos das mitoses nas criptas e no número de “placas de Peyer” (ALLEE e TOUCHETTE, 1999).

As mudanças na morfologia intestinal bem como nas suas funções digestivas e de transporte podem ser fisiológicas, ocorrendo com a idade ou em resposta a mudanças na dieta, bem como podem resultar de processos patológicos freqüentemente observados, tais como: diabetes mellitus, síndrome-do-intestino-curto, irradiação abdominal, alcoolismo e administração de drogas (WELLS e RHAME, 1990; THOMSON e KEELAN, 1996; WAHEED e GUPTA, 1997).

2.4.1 Nutrientes e adaptação intestinal

A adaptação intestinal ocorre em diferentes estados fisiológicos e patológicos. Está associada ás mudanças na estrutura e função, produzidas como resposta a um novo conjunto de demandas nutricionais. Essas alterações ocorrem por toda a extensão das

vilosidades do intestino. Elas também ocorrem durante toda a vida do animal (THOMSON e KEELAN, 1996). Existem referencias de que a farinha de soja pode causar um aumento da atrofia das vilosidades. Acredita-se que proteínas imunologicamente ativas da soja, tais como a glicinina e a β-conglicinina, são responsáveis por reações de hipersensibilidade que causam a atrofia das vilosidades (LI et al, 1990).

O fornecimento de uma dieta com farinha de soja como única fonte de proteína, ou de dietas “milho/soja”, para suínos, resultam em diminuição na altura das vilosidades na porção média do intestino delgado em comparação com dietas em que a caseína é a única fonte de proteína. Também, observa-se um aumento na profundidade das criptas em todas as zonas do intestino delgado (ALLEE e TOUCHETTE, 1999). Resultados semelhantes foram também, encontrados por CARUSO e DEMONTE (2005) para ratos que receberam dieta tendo concentrado protéico de soja, como única fonte proteica. Outros fatores, presentes na soja podem, também, causar alterações na morfologia da mucosa ou na digestibilidade. Entre eles se incluem: os taninos que diminuem a digestibilidade do nitrogênio; as lectinas que causam atrofia da mucosa, reduzindo a digestão e absorção de nutrientes; os inibidores de tripsina que alteram a digestibilidade; e a fibra, que reduz a altura das vilosidades ou aumenta a profundidade das criptas, o que resulta em ambos os casos em uma diminuição da relação entre as vilosidades e as criptas. (LIENER, 1994; ALLEE e TOUCHETTE, 1999).

Existem diferentes compostos que exercem efeito direto sobre o crescimento da mucosa: os fatores de crescimento, as poliaminas e alguns aminoácidos específicos. O papel destes foi bem observado na digestão dos leitões, reduzindo a atrofia intestinal durante a primeira semana após o desmame, permitindo assim melhora na digestão e na absorção dos nutrientes. Um dos fatores de crescimento que demonstra importante papel no crescimento intestinal é o fator de crescimento epidérmico (EGF) que alguns estudos demonstram estar presente no leite e que tem um efeito trófico sobre a mucosa intestinal (ALLEE e TOUCHETTE, 1999).

Caseínas

Em seu experimento, DAENZER et al (2001) mostraram que o ganho de peso em ratos alimentados com caseína é maior que os que recebem dieta de seus aminoácidos correspondentes. Relatam também, que a leucina derivada da caseína da dieta, é usada na síntese protéica do tecido e sustenta em humanos, um acréscimo protéico "*post prandia"l* muito maior do que a leucina derivada de proteínas do soro. Isso é atribuído à velocidade mais lenta de digestão e absorção da caseína comparada a das proteínas do soro.

Proteínas da Soja

A soja tem sido a cada dia, avaliada e reconhecida como importante fonte nutricional de proteínas, apesar de ter esse valor limitado, como tudo indica, pela sua estrutura interna, que resiste ao ataque proteolítico, diferentemente do que ocorre com as proteínas de origem animal. Os efeitos funcionais das proteínas da soja estão relacionados às suas propriedades físicas, fundamentalmente atribuídas à estrutura interna (DEMONTE, 1993).

Têm-se demonstrado diferentes reações adversas da soja, entre elas, a acentuada ação antigênica. Acredita-se que proteínas imunológicamente ativas da soja, tais como: a glicinina e a β-conglicinina, são responsáveis por reações de hipersensibilidade que causam a atrofia das vilosidades (LI et al, 1990; ALLEE e TOUCHETTE, 1999). Em bezerros, quando o leite é substituído por uma dieta à base de proteína de soja aparecem anticorpos específicos constituídos principalmente pela classe das imunoglobulinas-G (IgG). Esses anticorpos podem interferir com a função digestiva ao formar complexos com os antígenos da soja e o "fixador de complemento". A mucosa intestinal passa a apresentar atrofia das suas vilosidades e infiltração de linfócitos, quadro muito semelhante ao observado na intolerância à proteína da soja, em crianças. Nos camundongos, o fator Kunitz de inibição (KSTI) foi identificado como sendo o indutor da produção de anticorpos IgE. No entanto, essas proteínas são totalmente degradadas pelos ratos (DEMONTE, 1993). Em aves ficou demonstrado que o crescimento pode apresentar diferença significativa, quando galinhas alimentadas com caseína são comparadas com outras alimentadas com proteína de soja, somente em determinadas raças específicas (SHELTON et al, 2003).

O Soro do Leite

Todas as proteínas: imunoglobulina G (IgG); imunoglobulina A (IgA); α-lactalbumina (α-La); β-lactoglobulina (β-Lg); albumina de soro bovino (BSA); Lactoferrina (Lf); e lactoperoxidase (Lp), diminuem significativamente de concentração, na passagem do colostro para leite normal de consumo (SGARBIERI, 2004). Os conhecimentos sobre os mecanismos de ação fisiológica das proteínas do soro de leite são ainda muito incompletos, particularmente pouco se conhece sobre as funções e os benefícios de inúmeros componentes menores (natureza protéica ou não-protéica) presentes no soro e recuperados em maior ou menor proporção nos isolados protéicos. No conjunto, essas substâncias têm sido chamadas de fatores de crescimento celular, incluindo neste grupo, além da Lactoferrina, uma série de polipeptídios, incluindo os Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina I e II (IGF-I e IGF-II), Fator de Crescimento de Fibroblastos ácido e básico (aFGF, bFGF), Fator de Crescimento Transformador (TGF-β1 e TGF-β2), além de vários outros não identificados. No conjunto, essas substâncias estimulam a proliferação de variados tipos de células, podendo substituir, em boa parte, o soro fetal bovino comercializado com esta finalidade (BELFORD et al, 1995; SGARBIERI, 2004).

2.5 Lactoferrina

A Lactoferrina foi isolada, pela primeira vez, do leite bovino em 1939, e posteriormente em 1960, do leite humano. A Lactoferrina de coloração vermelha ou rosa clara, é uma glicoproteina de cadeia simples contendo 692 aminoácidos e peso molecular de 80 kDa; composta de aminoácidos semelhantes à proteína transportadora do ferro no plasma, a transferrina (55% da seqüência de aminoácidos é semelhante), portanto, trata-se de uma siderofilina. Apresenta duas formas: a holo-Lactoferrina (saturada de ferro) e a apo-Lactoferrina (sem ferro); no entanto, difere da transferrina nas propriedades imunológicas ou antigênicas e composição de carboidratos. Os sítios de ligação da Lactoferrina estão localizados na interface entre os dois domínios de cada lobo, chamados de N e C, similares e conectados através de uma região flexível. No entanto, a Lactoferrina não é capaz de se ligar somente aos íons ferro, pode, também, se ligar ao cobre, manganês, zinco, gálio e

alumínio (SANCHEZ et al, 1992; VORLAND, 1999). A ligação da holo-Lactoferrina com o ferro é desfeita pela precipitação com sulfato ácido de amônio, em pH 2, transformando-a em apo-Lactoferrina (STEVANATO, 2005).

Aproximadamente, 69% da seqüência de aminoácidos da Lactoferrina bovina é idêntica à humana, embora as conformações da cadeia polipeptídica sejam as mesmas. A estrutura tridimensional apresenta leve mudança na orientação dos domínios, com angulação menor do que a humana, e estas pequenas diferenças não parecem ter qualquer significado funcional. As estruturas tridimensionais da Lactoferrina humana e bovina foram determinadas a 2,8Å (1Å = 0,1nm) de resolução. A proteína é composta por dois lóbulos homólogos, cada um contendo uma fenda profunda, na parte inferior na qual o Fe^{3+} é ligado, junto com carbonato, como ânion. O local de ligação do ferro e a estrutura global da Lactoferrina são bastante semelhantes às da transferrina, proteína transportadora de ferro, no plasma. No entanto, a grande diferença entre as duas proteínas está na sua região N-terminal; na Lactoferrina, essa região é extremamente simples, contendo múltiplas Argininas e resíduos de Lisina, o que torna a Lactoferrina, uma proteína bastante básica em ralação à Transferrina. A Figura 1 mostra as estruturas tridimensionais da Lactoferrina bovina e humana determinadas por cristalografia de raios-X. Após a clivagem pela pepsina, a região do aminoácido 17 ao aminoácido 41 é liberada como “Lactoferricina B” da proteína de origem bovina, o que é destacado em verde na figura. O peptídeo liberado da Lactoferrina humana pela pepsina é maior, pois abrange os aminoácidos 1 a 45 da proteína intacta. A ligação peptídica entre os aminoácidos 11 e 12 é também hidrolisada no processo, mas a porção N-terminal permanece associada com o restante do peptídeo através de uma ligação dissulfeto. Na figura 1, o peptídeo “Lactoferricina H” é destacado em verde (aminoácidos 12-45) e amarelo (aminoácidos 1-11), como parte da estrutura da Lactoferrina humana (VOGEL et al, 2002).

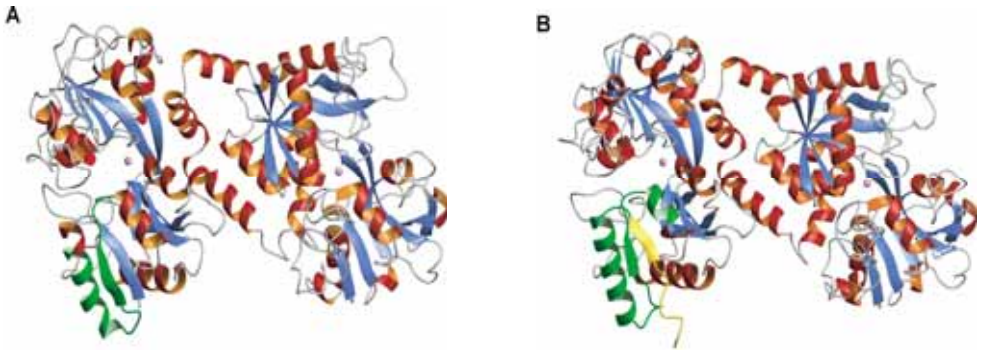

Figura 1 - Estrutura da Lactoferrina bovina (A) e humana (B). Apenas a estrutura secundária da cadeia principal (backbone) é mostrada. Azul representa folhas, vermelho e laranja representam hélices. As porções de lactoferricina B e H são destacadas em verde e amarelo (ver texto). (figura retirada de Vogel et al, 2002)

A Lactoferrina é encontrada, também em secreções externas: lágrima, saliva, secreção vaginal, sêmen e nos grânulos secundários dos neutrófilos. Sintetizada pela mucosa epitelial e por neutrófilos, é liberada em resposta a um estímulo. O colostro contém 7,0g/L de Lactoferrina, no leite humano cai para, aproximadamente, 2,0mg/mL, enquanto que no leite bovino é de 0,02 a 0,2mg/mL, no plasma está em pequena concentração, por volta de 0,2µg/mL (SANCHEZ et al, 1992; STEVANATO, 2005).

Uma das primeiras funções atribuídas à Lactoferrina foi o transporte de metais, especialmente o ferro. Posteriormente, descobriu-se que essa proteína, estrategicamente situada nas mucosas, fazia parte da primeira linha de defesa do organismo contra infecções microbianas, fúngicas e virais (CONNEELY, 2001; VAN DER STRATE et al, 2001). Ligando-se reversivelmente a dois íons férricos, é capaz de seqüestrá-los de certos patógenos ou do meio, resultando na redução do crescimento, enquanto que as subfrações que hidrolisam RNA e DNA podem contribuir para a hidrólise dos ácidos nucléicos bacterianos e virais. As subfrações de Lactoferrina humana purificada possuem cinco diferentes atividades enzimáticas: DNase, RNase, ATPase, fosfatase e hidrólise da malto-oligossacáride. Inclusive, algumas de suas subfrações cataliticamente ativas são citotóxicas, podendo induzir apoptose (SANCHEZ et al, 1992; STEVANATO, 2005).

Outra ação inibitória da Lactoferrina está limitada à região N-terminal que, com forte carga positiva, se liga aos lipopolissacarídeos da parede celular de microrganismos susceptíveis, carregados negativamente, resultando na sua permeabilização (Hendrixon et al, 2003). .Apresenta atividade antiviral para citomegalovírus, vírus da hepatite C e poliovírus e, inclusive, foi sugerida a sua associação com outras drogas, buscando usufruir do sinergismo entre elas, diminuindo possíveis reações adversas provocadas pelos antivirais (SANCHEZ et al, 1992; STEVANATO, 2005).

Não foram observados efeitos adversos, quando 2,0g/kg/dia de Lactoferrina foram administrados oralmente a ratos. Estudo clínico com doses orais de 600 a 2000mg de Lactoferrina foram administradas durante oito semanas a indivíduos adultos, com leve ou moderada "*tinea pedis"*, observando eficácia antifúngica e melhora dermatológica. A Lactoferrina não apresentou citotoxicidade em culturas de células, nas concentraç&es de 0,1 a 2,5mg/mL, quando incubadas por 24 horas a 37°C e em estudos de curto e longo prazo, não foram observados efeitos adversos quando enxaguatórios bucais contendo Lactoferrina de origem bovina foram usados diariamente, podendo tal fato ser resultante da similaridade estrutural e imunológica entre a Lactoferrina humana e bovina (STEVANATO, 2005). Dentre outras funções atribuídas à Lactoferrina, incluem-se atividade imunorregulatória, regulação da mielopoiese, efeitos antioxidantes e regulação da homeostase do ferro no trato gastrointestinal, promoção do crescimento e diferenciação celular. Receptores específicos para Lactoferrina têm sido descritos em vários tipos de células e tecidos de mamíferos, incluindo monócitos, linfócitos, plaquetas, fígado, células epiteliais, mamárias e Intestinais (SANCHEZ et al, 1992; CONNEELY, 2001; SUZUKI e LONNERDAL, 2002).

Em concentrações fisiológicas, a Lactoferrina estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos primários e também atua como fator inibidor de apoptose induzida. Também afeta a formação de osteoclastos e, em cultura de medula óssea de camundongos, a Lactoferrina inibe a osteoclastogênese "*in vivo*". A injeção local de Lactoferrina, acima da hemicalvaria em camundongos adultos, mostrou aumentos

significativos nos índices dinâmicos histomorfométricos da formação óssea e da área óssea. (NAOT et al, 2005).

Em um experimento com ratos, NORRBY (2004) demonstrou que a ingestão e a infusão subcutânea de apo-Lactoferrina humana (apo-hLF) aumentou significativamente a angiogênese mediada pelo Fator de Crescimento Endotelial Vascular-A (VEGF-A).

A Lactoferrina em combinação com o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) mostrou atividade estimuladora de crescimento celular em cultura de células do epitélio intestinal de ratos (IEC-18.) quando cultivadas por mais de 6 dias, utilizando meio contendo 0,2% de soro fetal bovino (HAGIWARA et al, 1995). Outro estudo, desenvolvido por SCHOTTSTEDT et al (2005) em bezerros, demonstrou os efeitos da ingestão de Lactoferrina e vitamina A adicionadas à fórmula básica de leite e a colostro, sozinhas ou em combinação, sobre o desenvolvimento do epitélio do intestino. Este estudo indicou que a proliferação celular no epitélio intestinal, principalmente no jejuno e íleo, é mais acentuada.

YANAIHARA (2000), trabalhando com cultura de células endometriais humanas, mostrou um efeito positivo da Lactoferrina na proliferação de células do estroma..

2.5.1 Receptores de Membrana para a Lactoferrina

As atividades biológicas induzidas pela Lactoferrina (Lf) vão depender do tipo de “célula alvo” e da presença de receptores específicos à Lf (LfRs) em sua superfície. As características dos LfRs parecem variar entre diferentes tipos de células. Parece haver pelo menos um tipo de LfR que é mais ou menos específicas para Lf, enquanto há outros mais "genéricos" que, além de receptores de outras moléculas também reconhecem Lf. Já foram descritos receptores em monócitos, linfócitos, células epiteliais e intestinais e ainda em plaquetas (CONNEELY, 2001).

2.5.2 Proteólise da Lactoferrina no trato gastrintestinal

Geralmente as proteínas administradas por via oral são hidrolisadas rapidamente no trato gastrintestinal e, portanto, podem perder qualquer atividade biológica que não seja uma função nutricional. Os primeiros relatos sobre a degradação proteolítica

da Lactoferrina “*in vitro*” mostraram apenas a estabilidade comparativa. No entanto, um peptídeo antimicrobiano mais potente que a Lactoferrina intacta, mesmo quando comparadas em quantidades equimolares, foi encontrado após a hidrólise desta pela pepsina. Esse peptídeo purificado e caracterizado, é a Lactoferricina (LFcin). A ocorrência natural de Lactoferricina, gerada no estômago, a partir da ingestão de Lactoferrina também tem sido documentada. Parece agora que a região LFcin não é apenas o centro antimicrobiano ativo da Lactoferrina, mas também pode desempenhar um papel importante nas interações entre Lactoferrina e seu receptor em linfócitos, entre Lactoferrina e glicosaminoglicanos e entre Lactoferrina e lipopolissacarídeos. Por ser considerada uma proteína estável e ter ação imunopotencializadora inespecífica no leite materno, fórmulas infantis em escala industrial, contendo LF íntegra, estão no mercado desde a década de 1980 (KUWATA et al, 2001).

Lactoferrina Intacta e fragmentos foram detectados na urina de bebês prematuros que receberam leite humano, emergentes aparentemente da absorção pelo intestino. Isto sugere que a Lactoferrina é parcialmente degradada no intestino e que sua absorção significativa ocorre no recém-nascido prematuro, devido ao desenvolvimento incompleto do sistema digestivo dos bebês, implicando na pouca degradação da Lactoferrina no trato gastrointestinal e absorção de moléculas quase intactas (SANCHEZ et al, 1992; KUWATA et al, 2001).

Em um estudo com ratos adultos que receberam leite enriquecido com Lactoferrina, KUWATA et al (2001) encontraram fragmentos dessa proteína no conteúdo do estômago, intestino delgado e intestino grosso. Eram fragmentos funcionais, tais como fragmentos contendo sitios de ligação para glicosaminoglicanos, bem como fragmentos de grandes dimensões com uma massa 0,20 kDa, no intestino delgado, sobreviventes à degradação proteolítica.

3 EXPERIMENTO I: Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas em coelhos.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Animais Experimentais

Foram utilizados seis coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, linhagem "Nova Zelândia", com seis semanas de idade, machos, com peso médio de 650 gramas, procedentes do Biotério Central da UNESP, Campus Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com estrado revestido de papel absorvente descartável com três trocas diárias. Receberam água filtrada e ração industrial, "*ad libitum*".

3.1.2 Solução de Lactoferrina do Soro de Leite Bovino

Para a solução tópica de Lactoferrina, foi utilizada a L9507 (Lactoferrin from bovine milk - Sigma-Aldrich Co), ressuspendida em solução NaCl 150mM, até obter a concentração final de 100µg/mL. Após a dissolução, a solução foi filtrada em membranas 0,22 µm e posteriormente, armazenada a ± 4℃, em frasco e sterilizado.

3.1.3 Procedimento Experimental

Após a anestesia com Xilazina 5mg/kg + Ketamina 35mg/kg (FLECKNELL, 1993), cada animal foi submetido à tricotomia da região dorsal, 2 cm posteriormente à linha escapular e em seguida, à antissepsia com solução iodopovidona 1%. Com auxílio de um molde metálico vazado, com 10 mm de diâmetro (± 80 mm^2 de área), a pele foi demarcada com caneta dermográfica em dois pontos, 40 mm eqüidistantes. A ferida cutânea foi produzida com lâmina de bisturi número 15 e a tela subcutânea divulsionada com tesoura de pontas "fina/fina" e pinça de dissecção, até sua ressecção. (Figura 2 e Figura 3). Para análise morfométrica computadorizada, a cada 24 horas as feridas foram fotografadas com câmera digital (Olympus D-390), apoiada em suporte especial que mantém sempre a mesma distância focal. O diâmetro também foi mensurado com paquímetro digital. De 24 em 24 horas, cada animal recebeu em uma das feridas (esquerda), 1mL de Lactoferrina a 100µg/mL em solução salina (NaCl 150mM). Na outra ferida (direita) foi administrada somente a solução salina.

Cada coelho recebeu Paracetamol (Acetaminophen) como analgésico, na dose de 10mg/kg por via oral, a cada 8 horas (BOLD et al, 1996). No décimo dia, os animais foram novamente anestesiados e agora removeram-se retalhos do tecido de cicatrização para os estudos histomorfométrico e histológico. A área de cicatrização foi removida incluindo 5 mm de pele adjacente às bordas da ferida, até atingir a camada muscular. Essas novas feridas foram suturadas com fio cirúrgico e os animais ficaram hospitalizados até a recuperação total dos cortes. Esse experimento foi submetido e aprovado (parecer nº 58/2009) pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara.

Todos os procedimentos cirúrgicos e reabilitação foram realizados na Clínica Veterinária “da Rua Zero”, no município de Araraquara/SP. As atividades laboratoriais foram efetuadas no Laboratório de Análises de Alimentos da UNESP – Campus Araraquara, Laboratório físico-químico e microbiológico de Controle da Qualidade do SKINLab pharmaceutica de Araraquara e Laboratórios de Química da Centro Universitário de Araraquara – UNIARA.

Figura 2 - Ressecção de um retalho de pele.

Figura 3 - As duas feridas cirúrgicas.

3.1.4 Tratamento do Material Coletado

3.1.4.1 Fixação

Os retalhos do tecido cicatricial foram fixados em formol 10% (solução tamponada pH 7,5), em frascos individuais identificados de 1 a 6 com FL (Ferida Lactoferrina) e FC (Ferida Controle).

3.1.4.2 Inclusão em parafina

Para as análises histológicas, imunohistoquímica e histoquímica os retalhos e segmentos dos retalhos, respectivamente identificados, foram submetidos à técnica padrão de desidratação em baterias crescentes de álcool etílico, xilol e inclusão em parafina fundida a 37^{o}C e posteriormente solidificada na temperatura ambiente.

3.1.4.3 Microtomia

Foram efetuados cortes, com 5µm de espessura, em micrótomo de navalha convencional, depositados em lâminas histológicas, devidamente identificadas com o mesmo código da fixação.

Cada lâmina foi constituída de três cortes de cada ferida, na sequência (1:3), alternando um corte utilizado e três descartados.

3.1. 4.4 Colorações

Previamente às colorações, foi utilizada a técnica convencional de desparafinização, reidratação. Após nova desidratação, os cortes foram diafanizados e efetuou-se a montagem definitiva com lamínula sobre Bálsamo do Canadá. Foram confeccionadas três lâminas para cada elemento dos grupos e para cada coloração.

3.1.4.4.1 Hematoxilina/Eosina e Tricrômio de Masson

Essas duas tradicionais colorações foram utilizadas, pois alguns parâmetros histológicos da cicatrização são facilmente evidenciados por Hematoxilina/Eosina e Tricrômio de Masson, podendo ser uniformemente quantificados. As lâminas receberam as identificações: FLT 1-6 (Ferida Lactoferrina) e FCT 1-6 (Ferida Controle) para a coloração por Tricrômio de Masson.; FLHE 1-6 (Ferida Lactoferrina) e FCHE (Ferida Controle) para a coloração por Hematoxilina e Eosina.

3.1.4.4.2 Histoquímica por Picrosírius para colágeno.

Para o estudo do colágeno tecidual o corante picrosírius é específico, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma. Além disso, é seletivo, pois ao microscópio de luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I sendo mais espessas e birrefringentes se apresentam com coloração em tons de laranja a vermelho. Já as fibras

mais delgadas pouco birrefringentes e mais dispersas do colágeno tipo III, apresentam-se esverdeadas. Dessa maneira, *softwares* para a determinação da área ocupada por determinada cor e, mesmo diferenças de intensidade desta, permitem quantificar o colágeno que lhe é específico, através de um computador (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978).

As lâminas foram coradas em solução de Picrosirius Red (0,5g Sirius vermelho F3B “IPC 35782, Sigma-Aldrich” em 500ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico) por 60 minutos. Depois foram lavadas em duas passagens de água acidificada (5ml ácido acético em 1L de água). Realizou-se, a seguir, a desidratação em bateria de álcool crescente, diafanização com xilol e a montagem definitiva. (Labiocel USP, 2002)

3.1.4.4.3 Imunohistoquímica Avidina-Biotina Peroxidase (ABP)

A técnica idealizada por HSU et al (1981) indica, em tons castanhos, a positividade para miofibroblastos.

Para boa aderência dos cortes nas lâminas de vidro, as mesmas foram previamente silanizadas: acetona PA por dois minutos; ATPS (silano “Sigma A3648” 4% em acetona) por dois minutos; 4 passagens em acetona PA; e secagem em estufa.

Após a desparafinização e reidratação dos cortes histológicos, as lâminas foram transferidas, em tampão citrato (pH 6,0), para forno de microondas por quinze minutos. Passaram, então, para tampão fosfato e peróxido de hidrogênio 3% + metanol, por vinte minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Em lâminas identificadas aplicou-se então, o anticorpo primários anti-α-actina muscular lisa (Monoclonal Mouse Smooth Muscle Actin Clone 1A4 Code M0851, Dako Cytomation, EUA) incubando-as por doze horas à temperatura de 4℃. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotinilado por trinta minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por trinta minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contracoloração com hematoxilina. Os cortes foram desidratados e realizou-se a montagem definitiva (HSU et al, 1981).

3.1.5 Análises Histológicas

3.1.5.1 Análises das Lâminas Histológicas (H.E e T.M)

Para todas as análises histológicas foram avaliados três campos em cada lâmina, dois campos próximos à região de transição com tecido normal, em lados opostos e um campo central. Nas lâminas coradas por Hematoxilina/Eosina (H.E) foram avaliados: o grau de epitelização, a intensidade da reação inflamatória local, o tipo de reação inflamatória conforme a célula predominante, a presença de tecido de granulação, a neovascularização. Pelo Tricômico de Masson (T.M) avaliou-se a intensidade de fibras colágenas presentes nos locais de fibrose instersticial. Exemplos de lâminas coradas por H.E e T.M podem ser observados nas Figuras 4 e 5, respectivamente na página 43.

As lâminas tiveram suas identificações camufladas e foram avaliadas por três observadores credenciados. Os dados obtidos classificaram-se de acordo com a intensidade do achado e foram transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de um índice para a observação histológica encontrada, conforme demonstrado no Quadro 1 (ver em Resultados, item 6.1.1). As intensidades dos achados de H.E e T.M foram analisadas através dos seguintes critérios: Proliferação Vascular – foi considerada *ínfima*, quando não se observava, ou se observava raros vasos sanguíneos; *moderada*, quando eram visualizados poucos vasos e isolados no campo; *regular*, quando observados com maior freqüência e dispersos no corte; e *acentuada*, quando observados em grande presença, dispostos em todo o campo. Proliferação fibroblástica – foi classificada em *ínfima*, na ausência de fibroblastos ou em número inferior a três; *moderada*, ao serem observados, pouco acima de três fibroblastos em meio a tecido conjuntivo colágeno frouxo; *regular*, quando havia considerável quantidade de fibroblastos em curtas fileiras dispostas em diferentes direções; e *intensa*, quando se visualizava espessas agregações de fibroblastos dispostas em diferentes direções. Colagenização – tido como ausente, quando não havia deposição de fibras colágenas ou em número inferior a três fibras; moderada, quando as fibras colágenas apareciam depositadas pequena quantidade em meio aos fibroblastos proliferados; regular, se a deposição de colágeno formava feixes espessos de fibras azuladas, intercaladas com conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e intensa, na

visualização de enorme depósito de fibras colágenas, constituindo feixes espessos de fibras azuladas, compactados entre fibroblastos proliferados e ausência de tecido conjuntivo colágeno frouxo. Reepitelização – classificou-se como ínfimo, quando havia raríssimas células epiteliais ou então nenhuma; moderado, quando se observava epitélio ainda discretamente formado; regular, quando já se observava epitélio formado de maneira incompleta; e acentuada, ao se observar a epiderme totalmente constituída. Todos os dados de cada ferida foram registrados em planilhas.

A análise das células Polimorfonucleares e das Mononucleares foi realizada diretamente em microscópio óptico, com aumento de 400X, contando-se o número de leucócitos observados em três campos de cada uma das três lâminas correspondentes, transformando-se os respectivos valores de cada um dos dois tipos celulares, em percentagem.

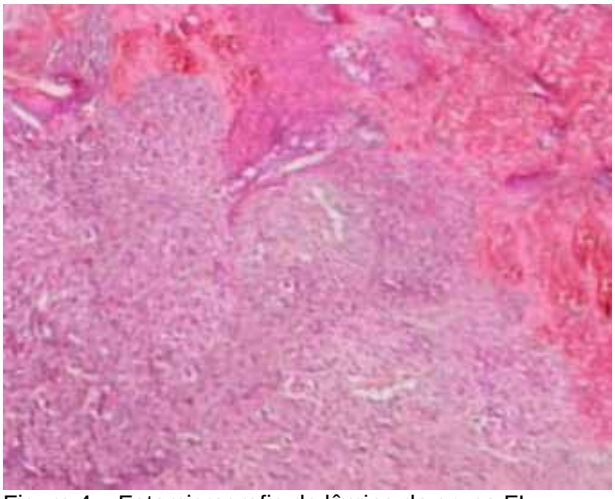

Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina do grupo FL corada por H.E (40X).

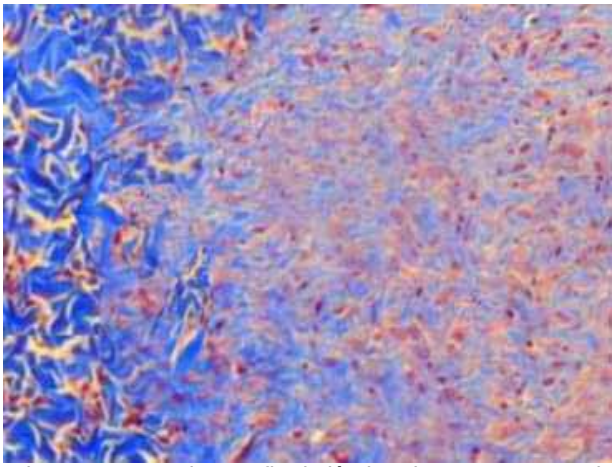

Figura 5 - Fotomicrografia de lâmina do grupo FL corada por Tricrômio de Masson, (100X).

3.1.5.2 Análise das lâminas da técnica de picrosírius para colágeno

Essa técnica foi utilizada para identificação de colágenos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III). Para a análise morfométrica, utilizou-se o método computadorizado, o qual quantifica a percentagem de deposição de cada tipo específico de colágeno. Os cortes histológicos foram observados em microscópio óptico, modelo BX50 (Olympus America Inc, EUA), com luz polarizada, no aumento de 200 vezes, em três campos distintos. As imagens foram capturadas por câmera digital Sony SSC-DC54 (Sony Electronics Inc) e enviadas a um computador Pentium IV equipado com monitor LG Flatron E1940 (LG Eletronics BR). Cada campo foi capturado em resolução 640 pontos na horizontal e 480 pontos na vertical. A imagem digitalizada, com 16 milhões de cores e cada um dos campos, correspondeu a uma área 395μm de largura por 300μm de altura na imagem real. A análise foi feita através do aplicativo Pixcavator IA 4.3 para Windows. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema *RGB* (*Red*, *Green, Blue*) foram considerados valores para preto (fundo), para tons de vermelho (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). (Figura 6).

Calculou-se a percentagem da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada. A percentagem de área ocupada pelo colágeno tipo I – maduro (fibras espessas e fortemente birrefringentes com coloração avermelhada) e pelo colágeno tipo III – imaturo (fibras finas e dispersas, fracamente birrefringentes com coloração esverdeada) foi calculada para cada ferida, considerando-se que esta percentagem era proporcional à quantidade de cada tipo de fibra presente nos cortes histológicos (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978).

Com base nas percentagens de colágeno tipo I e tipo III, criou-se o índice da maturação do Colágeno - IMaC definido como a razão entre essas percentagens (ver EQUAÇÃO 1). Este índice varia entre zero (percentagem de colágeno tipo I = 0 e percentagem de colágeno tipo III = 100) e mais infinito (percentagem de colágeno tipo I = 100 e percentagem de colágeno tipo III = 0). Valores maiores que 1 (um) indicam

que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno tipo III (COELHO-LEMOS et al, 2004).

Equação 1 – Índice da Maturação do Colágeno (IMaC)

$$IMaC = \frac{\%\ \text{de Colágeno Tipo I – Maduro}}{\%\ \text{de Colágeno Tipo III – Imaturo}}$$

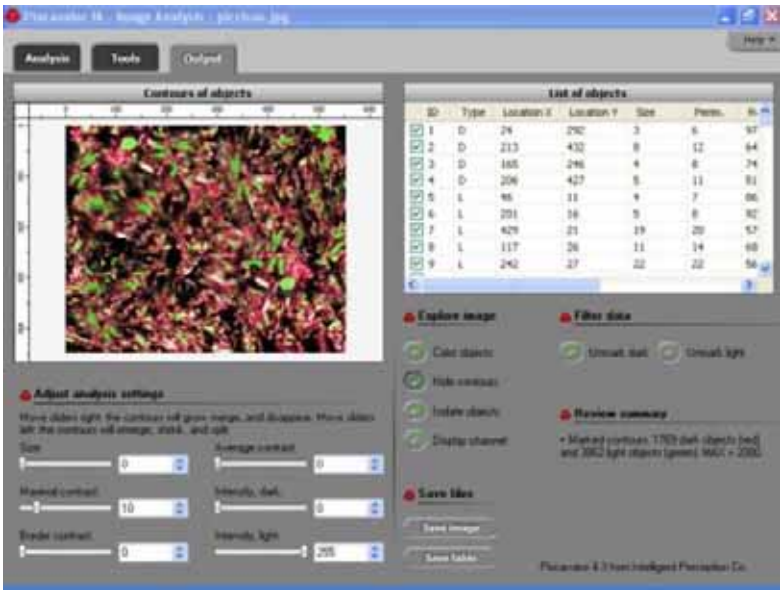

Figura 6 - Tela do Pixcavator com Fotomicrografia de corte histológico corado pelo picrosírius (200x), identificando colágeno tipo I na coloração avermelhada colágeno tipo III na coloração esverdeada

3.1.5.3 Análise das lâminas de imunohistoquímica

A identificação positiva da coloração imunohistoquímica foi dada pelas áreas de pigmentação acastanhada. Foram utilizados controles positivos e negativos.

3.1.5.3.1 Número e Área de Miofibroblastos

Foram contadas e mensuradas as células evidenciadas pela técnica imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-α-actina muscular lisa, em microscópio óptico, modelo BX50 (Olympus America Inc, EUA), no aumento de 400X, em três campos distintos. As imagens foram capturadas por câmera digital Sony SSC-DC54 (Sony Electronics Inc) e enviadas a um computador Pentium IV equipado com monitor LG Flatron

E1940 (LG Eletronics, BR). Cada campo foi capturado em resolução 640 pontos na horizontal e 480 pontos na vertical. A imagem digitalizada, com 16 milhões de cores e cada um dos campos, correspondeu a uma área 197,5 µm de largura por 150,0 µm de altura na imagem real. O número e área dos miofibroblastos foram determinados no programa ImageJ 1.44p (Nat. Inst. of Health, USA), analisando-se as imagens individualmente, marcando-se essas células por meio da ferramenta *Freehand Select* (Figura 7).

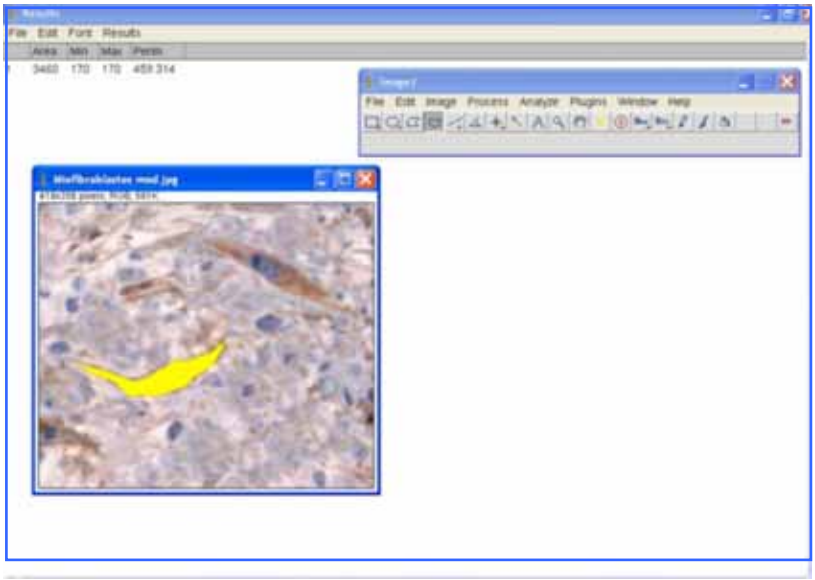

Figura 7 – Tela do ImageJ para mensuração da área do miofibroblasto
(em amarelo) evidenciado pelo anticorpo primário anti-α-actina muscular lisa. (400X + zoon).

3.1.6 Morfometria das Feridas Cirúrgicas

As imagens digitais das feridas cirúrgicas, obtidas a cada 24 horas, nos dez dias do experimento, por câmera digital Olympus D-390 (Olympus Optical Co), foram enviadas a um computador Pentium IV equipado com monitor LG Flatron E1940 (LG Eletronics BR) e mensuradas através do software Analisador de Imagens " Pixcavator IA V: 4.3.0.0.". (Figura 8). Os diâmetros das feridas foram, também, mensurados diariamente, através de paquímetro digital (Lee Tools).

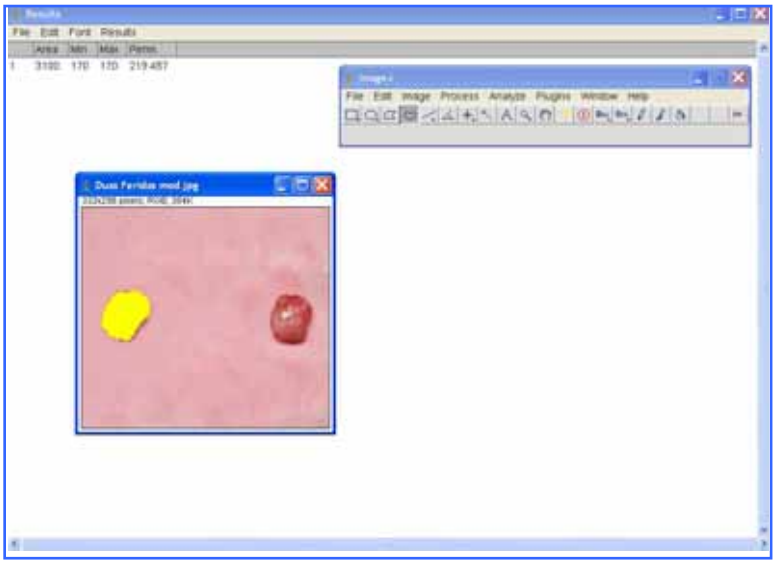

Figura 8 – Tela do ImageJ para mensuração da área da ferida (em amarelo)

3.1.7 Análise Estatística

As variáveis avaliadas no estudo foram: as intensidades da proliferação vascular, da proliferação fibroblástica, da colagenização e da reepitelização; percentagens de células mononucleares e polimorfonucleares; percentagens dos colágenos tipo I e tipo III e índice de maturação do colágeno (IMaC); número e área dos miofibroblastos; e área e percentagem de contração das feridas cirúrgicas. Conforme a natureza dos dados analisados nos grupos Ferida Controle (FC) e Ferida Lactoferrina (FL), procedeu-se ao tratamento estatístico adequado. Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, com os resultados expressos como média ± desvio-padrão. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney cuja importância é ser uma alternativa não paramétrica ao “teste t” para a diferença de médias, tratando todos os dados como uma grande e única amostra. Nas demais comparações foi utilizada a análise de variância, “ANOVA” *fator duplo com repetição*, com nível de significância (alfa) $p \leq 0,05$, para comparar os valores obtidos em todos os campos e não somente pelas médias dos mesmos, bem como, para as análises morfométrica e de contração das feridas.

Também foram efetuadas as análises de Regressão Linear e Correlação na comparação dos valores obtidos para as variáveis estudadas.

Como ferramentas para a análise estatística foram utilizados o programa “PAST version 1.99”, Excel (Microsoft Co) e BioEstat 5.0.

4 EXPERIMENTO II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia induzida em intestino delgado de ratos.

4.1 - MATERIAL E MÉTODOS II

4.1.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, albinos, com idade de 40 dias, peso médio de 123,8 ± 1,2 gramas, alimentados com ração comercial e fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu.

4.1.1.1 Recepção e adaptação dos animais

A recepção constou de 24 animais, em duas gaiolas de transporte com 12 animais cada, com bebedouro plástico gotejante. Todos foram submetidos à avaliação médico-veterinária, para serem detectadas possíveis alterações clínicas e/ou anatômicas.

Os animais tiveram um período de adaptação por três dias, recebendo ração comercial (Labina ® - Purina) e água “*ad libitum*” e mantidos nas seguintes condições: ventilação forçada; umidade e temperatura controladas entre 50-60% e 22^{o}C ± 1^{o}C respectivamente; e período de “claro e escuro” de 12 horas.

4.1.1.2 Pesagem dos animais

No quarto dia, considerado o primeiro dia do experimento, os animais foram submetidos à primeira pesagem em balança eletrônica semi-Analítica Shimadzu - Série BL-3200H, para se conseguir uma homogeneidade aproximada dos pesos corporais entre os grupos a serem estabelecidos. Foram separados em quatro grupos de seis animas.

Foram novamente pesados no quinto, no décimo e no décimo quinto dias do experimento, para análise estatística. As médias das quatro pesagens por grupo podem ser visualizadas no Apêndice 13 (ver Apêndices).

4.1.1.3 Identificação e isolamento dos animais

Os animais foram transferidos para gaiolas individuais de aço inoxidável, com o piso forrado por papel absorvente, o qual teve três trocas diárias durante o experimento.

Em seguida, os quatro grupos de animais (seis animais por grupo), segundo o tipo de ração a receber, com ou sem suplemento de Lactoferrina, foram identificados com os seguintes códigos: **Ci** (Caseína isoladamente); **CL** (Caseína mais Lactoferrina); **Si** (Soja isoladamente); e **SL** (Soja mais Lactoferrina).

4.1.2 Dietas

Cada animal recebeu diariamente 10g da sua ração (AIN-93) correspondente em cocho de aço inoxidável destacável e água "*ad libitum*" em bebedouro gotejante de aço inoxidável e vidro.

A Lactoferrina (Bioferrin 1000® - Apolactoferrin, Glanbia Nutritionals) 200mg/kg foi administrada dissolvida em 1,0mL de água destilada (200mg/mL), por gavagem uma vez ao dia (Fig. 9). A dose e modo de administração foram estabelecidos com base em outros experimentos (Togawa et al, 2002; Wakabayashi et al, 2004; Varadhachary et al, 2004; Shin et al, 2005).

Para se fazer uma avaliação diária da atividade e condições do transito intestinal, as fezes e ração desprezada por cada animal, foram colhidas e pesadas. As fezes de todos os animais apresentaram-se com consistência firme e coloração acinzentada com normais pequenas variações na tonalidade. O odor também se mostrou característico durante todo o experimento, portanto sem sinais de qualquer anormalidade do sistema digestório.

4.1.2.1 Preparo das Rações - recomendações da AIN-93 (Tavano, 2002).

A composição das rações e os componentes utilizados no preparo podem ser visualizados nos Apêndices 26 e 27 respectivamente (ver Apêndices).

- Foi separado do peso do amido o equivalente a 10% do peso total da ração.

- Adicionada água destilada, o equivalente a 60% do peso.

- Homogeneizado e aquecido em temperatura branda até a formação da goma.

4.1.2.2 Mistura dos componentes

Os pós foram triturados e misturados em almofariz, iniciando pelos mais granulados. O óleo e a goma foram gradualmente adicionados à mistura dos pós formando uma massa homogênea. Na seqüência, a massa foi transformada em pequenos "peletes cilíndricos", com aproximadamente 1,5 cm de comprimento por 0,5 cm de diâmetro. Os "peletes" foram levados à secagem em estufa de ventilação forçada, à 40^{o} C de temperatura e pelo tempo aproximado de 12 horas.

Retirados da estufa, os "peletes" apresentavam-se devidamente secos, com a dureza desejada para roedor, sem alteração na cor (branco-creme), com odor semelhante a "leite em pó" (agradável) para a ração caseína e odor característico (agradável) para a ração soja. As rações foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas na parte inferior de geladeira, a aproximadamente 9 ^{o}C.

4.1.3 Procedimento Experimental

Durante quinze dias, um grupo de seis animais (SL 1-6) recebeu ração tendo como fonte protéica a Soja e ainda, a Lactoferrina por gavagem, uma vez ao dia. Outro grupo de 06 animais (Si 1-6) recebeu a ração Soja sem suplemento de Lactoferrina. Um terceiro grupo: (CL 1-6) recebeu ração tendo como fonte protéica a Caseína mais suplementação de Lactoferrina e o último grupo, (Ci 1-6) recebeu a ração Caseína sem suplementação de Lactoferrina. No pré-operatório imediato receberam apenas dieta líquida (Sacarose 10%) por um período de 12 h.

Figura 9 – Rato recebendo Lactoferrina por gavagem.

4.1.3.1 Procedimento Cirúrgico

No décimo sexto dia, os animais foram anestesiados com Xilazina 5mg/Kg associada à Ketamina 50mg/Kg. Cada um foi submetido à tricotomia da região ventral e à antissepsia com solução iodopovidona 1%. Por laparotomia mediana, 4 cm a partir do apêndice xifóide, um segmento, com 10 mm de comprimento, foi seccionado da porção inicial do intestino delgado, tomando como referência 15 mm da junção gastro-duodenal (Figura 10 e Figura 11). Para a execução da segunda parte do experimento (Experimento 2 – parte 2), as bordas intestinais foram submetidas à anastomose termino-terminal com fio de polipropileno 6-0 (Ethicon ® -M8709) em pontos simples separados (Figura 12). A parede abdominal foi fechada em dois planos com fio de nylon 4-0 (Ethicon ®).

4.1.3.2 Procedimento Pós-Cirúrgico

No pós-operatório imediato, a mesma dieta líquida pré-operatória, foi mantida por 36 h. A partir de então os grupos voltaram a receber sua dieta sólida anterior.

O corte cirúrgico foi submetido à limpeza com soro fisiológico duas vezes ao dia. Ainda no pós-operatório imediato todos os animais receberam como analgésico, o cloridrato de tramadol 20mg/kg a cada 6 horas durante as primeiras 24 horas, por via subcutânea. Foi empregada ampicilina sódica, 40mg/kg por via intramuscular, como cobertura antibiótica em dose única.

Os seguimentos seccionados dos intestinos foram submetidos às técnicas histológicas convencionais para a histomorfometria das vilosidades e criptas intestinais e à imunohistoquímica, para a avaliação dos miofibroblastos quanto a número e tamanho.

Esse experimento (parte I e II) foi submetido e aprovado (parecer nº 06/2011) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Campus Araraquara.

Figura 10 – Animal anestesiado e preparado.

Figura 11 – Laparotomia e exposição gastrintestinal.

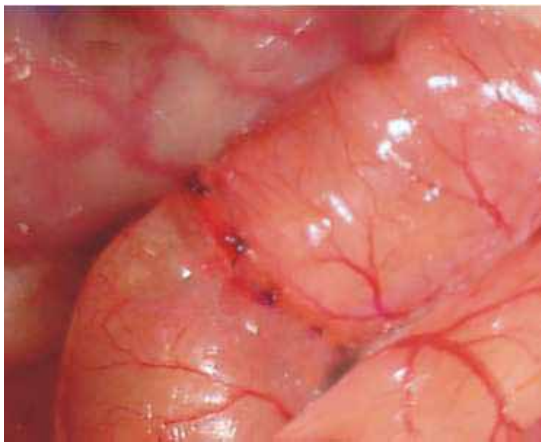

Figura 12 – Anastomose suturada.

4.1.4 Tratamento do Material Coletado

4.1.4.1 Fixação

Os segmentos de intestino foram fixados em formol 10% (solução tamponada pH 7,5), em frascos individuais com as identificações dos grupos e seus respectivos animais: CL (1-6); Ci (1-6); SL (1-6); e Si (1-6).

4.1.4.2 Inclusão em parafina

Para as análises histológicas, imunohistoquímica os segmentos de intestino, respectivamente identificados, foram submetidos à técnica padrão de desidratação em baterias crescentes de álcool etílico, xilol e inclusão em parafina fundida a 37^{o}C e posteriormente solidificada na temperatura ambiente.

4.1.4.3 Microtomia

Foram efetuados cortes, com 4 µm de espessura, em micrótomo de navalha convencional, depositados em lâminas histológicas, devidamente identificadas com o mesmo código da fixação.

Foram confeccionadas seis lâminas dos segmentos intestinais de cada animal. Três lâminas com cortes longitudinais e três com cortes transversais. Cada lâmina foi constituída de três cortes de cada segmento intestinal, na sequência (1:3), alternando um corte utilizado e cinco descartados.

4.1.4.4 Colorações

Previamente às colorações, foi utilizada a técnica convencional de desparafinização, reidratação. Após nova desidratação, os cortes foram diafanizados e efetuou-se a montagem definitiva com lamínula sobre Bálsamo do Canadá..

Para a visualização e mensuração das vilosidades e criptas intestinais foi utilizada a técnica convencional de coloração por Hematoxilina e Eosina (H.E.) (Figura 13).

A imunohistoquímica foi utilizada para evidenciar os miofibroblastos. (Figura 14) A técnica usada é a mesma descrita no Experimento I (ver pagina 41). Na segunda parte do experimento utilizou-se além do anticorpo anti-actina muscular lisa, também o anticorpo primário anti-fator VIII que evidencia os vasos sanguíneos em cor marrom (Figura 15).

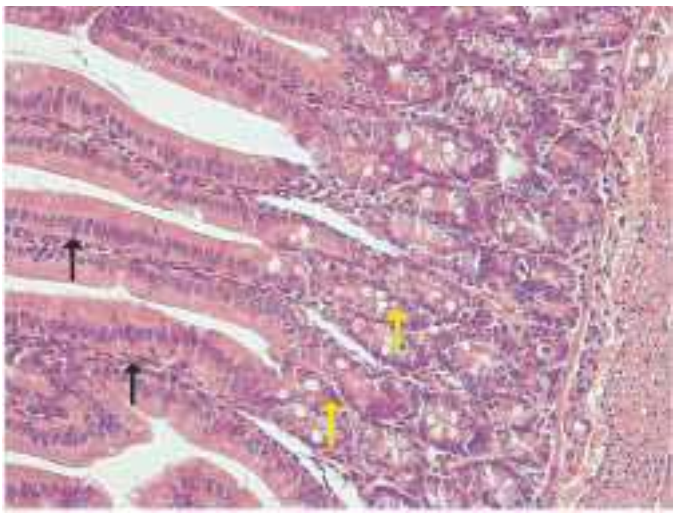

Figura 13 – Vilosidades (seta preta) e Criptas (seta amarela)
em Lâmina corada por H.E. (100X) (Fotomicrografia)

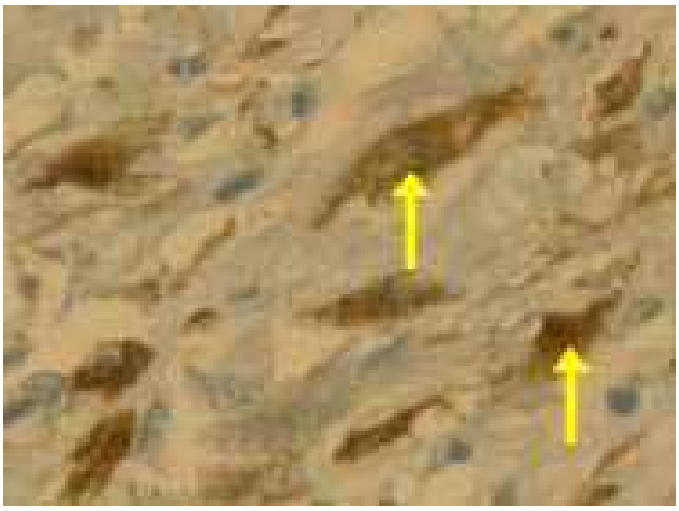

Figura 14 – Miofibroblastos (seta amarela) evidenciado pelo
anticorpo primário anti-α-actina muscular lisa; (400X + zoon). (Fotomicrografia)

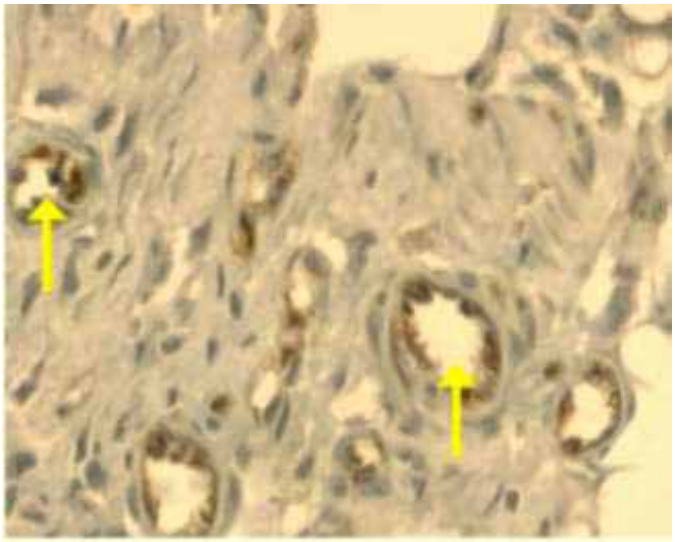

Figura 15 – Vasos sanguíneos (seta amarela) evidenciados
pelo anticorpo primário anti-fator VIII ; (400X + zoon). (Fotomicrografia)

4.1.5 Análises das Lâminas

As observações e mensurações microscópicas das estruturas foram realizadas em microscópio óptico, modelo BX50 (Olympus America Inc, EUA), no aumento de 400X, em três campos distintos. As imagens foram capturadas por câmera digital Sony SSC-DC54 (Sony Electronics Inc) e enviadas a um computador Pentium IV equipado com monitor LG Flatron E1940 (LG Eletronics, BR). Todas as mensurações foram efetuadas através do programa ImageJ 1.44p (Nat. Inst. of Health, USA).

O comprimento da vilosidade (CV) foi tomado a partir da região basal da mesma, que coincide exatamente com a porção superior das criptas. Traçou-se uma reta entre os dois pontos da base e outra reta paralela à primeira, tangenciando o ápice do vilo. A distância em µm, fornecida pelo analisador de imagens, entre estas duas retas corresponde ao comprimento do vilo no sentido longitudinal (Figura 16). A profundidade da cripta (PC) foi tomada da sua base até a região de transição cripta-vilo.

Foram medidos os comprimentos de 20 vilosidades e profundidade de 20 criptas que se apresentavam mais regulares em cada lado dos cortes.

Para essas mensurações foram utilizadas as lâminas confeccionadas em corte longitudinal e coradas por H.E. As estruturas foram medidas de ambos os lados (direito e esquerdo) do corte para se atenuar, através de médias, quaisquer alterações de mensuração devidas a uma possível inclinação da peça no momento da inclusão em parafina. Foram mensuradas 160 vilosidades e 80 criptas por animal do experimento, perfazendo um total de 960 vilosidades e 480 criptas para cada grupo de dieta.

O número dos miofibroblastos foi determinado por contagem direta. As áreas dos miofibroblastos foram obtidas no programa ImageJ 1.44p, analisando-se as imagens individualmente, marcando-se essas células por meio da ferramenta *Freehand Select* como pode ser observado na figura 17.

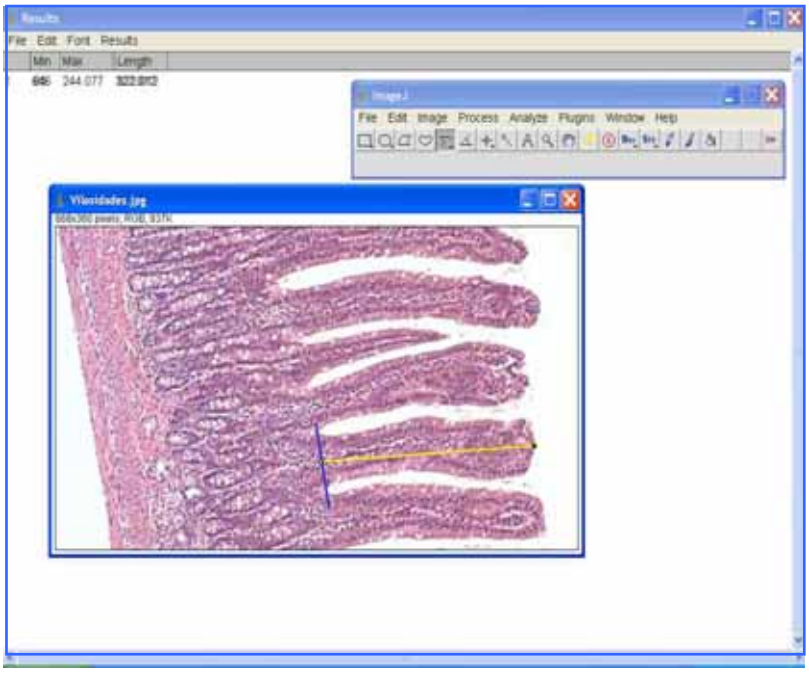

Figura 16 – Mensuração do comprimento da vilosidade com a ferramenta Straight Line do ImageJ.

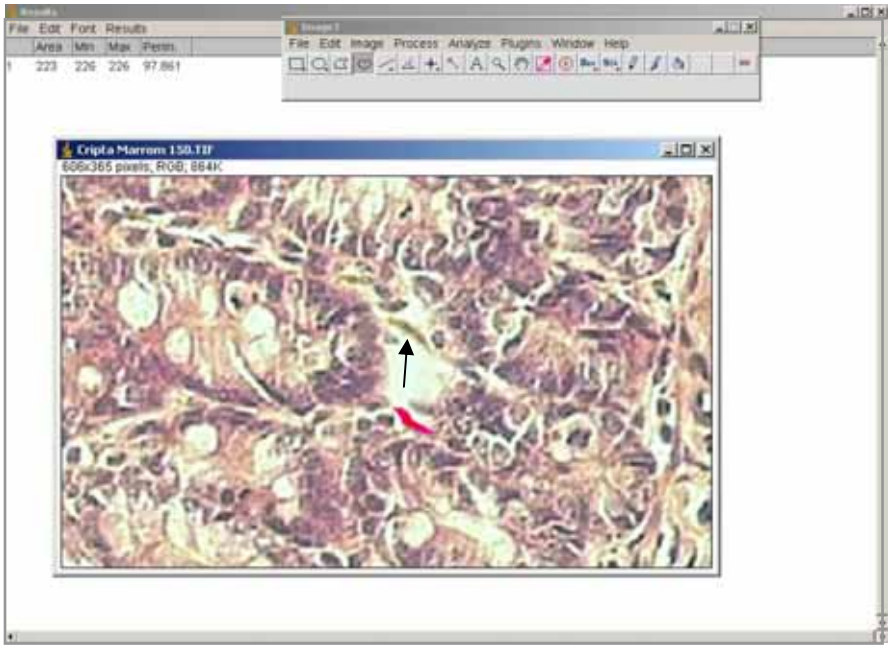

Figura 17 – Determinação da área do miofibroblasto da pericripta, com a ferramenta Freehand Selections no ImageJ.
Miofibroblasto demarcado (vermelho); Miofibroblasto sem demarcação (seta preta).

4.1.6 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizada a análise de variância, “ANOVA” *fator duplo com repetição*, com um nível de significância (alfa) $p \leq 0,05$, para comparar os valores obtidos na mensuração de todas as vilosidades e criptas de ambos os lados do corte e não somente pelas médias dos mesmos. Para a análise da comparação do peso dos animais

entre os grupos, foi utilizado o Teste t de Student, também com nível de significância (alfa) $p \leq 0,05$.

Foram efetuadas as análises de Regressão Linear e Correlação para comparar os valores obtidos para as variáveis estudadas.

Como ferramentas para a análise estatística foram utilizados o programa “PAST version 1.99”, Excel (Microsoft Co) e BioEstat 5.0,

5 EXPERIMENTO II – Parte 2: Estudo da Lactoferrina na cicatrização de enteroanastomose em intestino delgado de ratos.

5.1 - MATERIAL E MÉTODOS III

No sétimo dia após o reinício da dieta sólida os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia (Quetamina-Xilasina) e se efetuou a secção de segmentos do intestino delgado contendo a área de cicatrização da anastomose. Nesses segmentos foram avaliadas as características cicatriciais histológicas quanto à quantidade e tipo de colágeno predominante, neovascularização e tipos celulares.

5.1.1 - Tratamento do Material Coletado

A Fixação e Inclusão em Parafina seguiram as mesmas técnicas citadas anteriormente na Parte 1 do Experimento II.

Foram efetuados cortes longitudinais, com 4 µm de espessura, em micrótomo de navalha convencional, depositados em lâminas histológicas, devidamente identificadas com o mesmo código da fixação.

Foram confeccionadas três lâminas dos segmentos intestinais de cada animal.. Cada lâmina foi constituída de três cortes de cada segmento intestinal contendo a faixa de cicatrização da anastomose, na sequência (1:3), alternando um corte utilizado e cinco descartados.

5.1.1.1 - Colorações e Análises das Lâminas

Para a visualização e contagem de células polimorfonucleares e mononucleares utilizou-se a técnica convencional de coloração por Hematoxilina e Eosina. Essa coloração

também auxiliou para se identificar a faixa de cicatrização da anastomose, a fim de orientar a análise das técnicas imunohistoquímica e histoquímica.

A imunohistoquímica foi utilizada para evidenciar e quantificar os miofibroblastos e os vasos sanguíneos. Utilizou-se a técnica como citada anteriormente no Experimento I, (pág. 41) porém desta vez foi utilizado também o anticorpo primário anti-fator VIII *(Policlonal, Código 0082, Dako-Cytomatio,* Carpinteria, EUA) em lâminas distintas, para evidenciar em cor marrom os vasos sanguíneos, facilitando sua quantificação (Werner, 2002).

As observações, contagem e mensurações de miofibroblastos, vasos sanguíneos em microscopia óptica foram efetuadas nos mesmos equipamentos citados anteriormente (pág. 55).

No estudo do Colágeno Tipo I, Tipo III e Colagenização, foi utilizada a técnica histoquímica de Picrosírius descrita no Experimento I (pág. 40) e os equipamentos utilizados foram os mesmos citados no Experimento I (pág. 44).

Todos os parâmetros foram avaliados em três campos de cada um dos três cortes histológicos em cada uma das três lâminas correspondentes a cada animal do respectivo grupo.

5.1.2 Análise estatística

Na análise estatística para deposição de colágeno Tipo I, Tipo III e Índice de Maturação do Colágeno (IMC) foi utilizado o teste ANOVA. Para os demais parâmetros analisados, utilizou-se o Teste **t** de Student. Para todas as análises adotou-se o nível de significância (alfa) $p \leq 0,05$.

Foram efetuadas as análises de Regressão Linear e Correlação para comparar os valores obtidos para as variáveis estudadas.

Como ferramentas para a análise estatística foram utilizados o programa “PAST version 1.99”, Excel (Microsoft Co) e BioEstat 5.0,

6 – RESULTADOS

6.1 - Resultados do Experimento I - Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas, em coelhos.

6.1.1 - Resultados dos parâmetros histológicos quanto à intensidade de:

proliferação vascular; proliferação fibroblástica; colagenização; e reepitelização.

O Quadro 1, mostra a relação dos índices que foram utilizados nas atribuições dadas às intensidades dos achados histológicos, nas lâminas coradas por Hematoxilina/Eosina (H.E) e Tricrômio de Mason (T.M), para a análise não paramétrica pelo Teste de Mann-Whitney.

Quadro 1 – Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos de H.E e T.M para o teste não-paramétrico de Mann-Whitney

	Intensidade dos Achados			
Achados HE/TM	ínfimo	moderado	regular	acentuado
Proliferação vascular	0 a 0,99	1 a 1,99	2 a 2,49	2,50 a 3,0
Proliferação fibroblástica	0 a 0,99	1 a 1,99	2 a 2,49	2,50 a 3,0
Colagenização	0 a 0,99	1 a 1,99	2 a 2,49	2,50 a 3,0
Reepitelização	0 a 0,99	1 a 1,99	2 a 2,49	2,50 a 3,0

HE/TM = lâminas coradas por Hematoxilina/Eosina e Tricrômio de Mason.

6.1.1.1 Proliferação Vascular (PfVc) - Angiogênese

As médias das classificações obtidas por animal e a organização dos dados na avaliação da intensidade da proliferação de vasos sanguíneos, são mostradas nos apêndices 1 e 2 (ver em Apêndices). No grupo Controle, a angiogênese foi considerada moderada em cinco feridas e regular em uma. No grupo Lactoferrina foi classificada como regular em 4 feridas e acentuada em duas (ver Tabela 1). Houve diferença significante a favor do Grupo Lactoferrina (FL) com $p < 0,01$, conforme pode se observar Figura 18 e na Tabela 5. As figura 22 e 23 mostram uma das lâminas do grupo Controle (FC) e uma do grupo Lactoferrina (FL), respectivamente.

Tabela 1 – Classificação da proliferação vascular (Teste de Mann-Whitney).

Classificação	n FC	n FL
ínfimo	0	0
moderado	5	0
regular	1	4
acentuado	0	2

nFC = número de Feridas Controle ; nFL = número de Feridas Lactoferrina

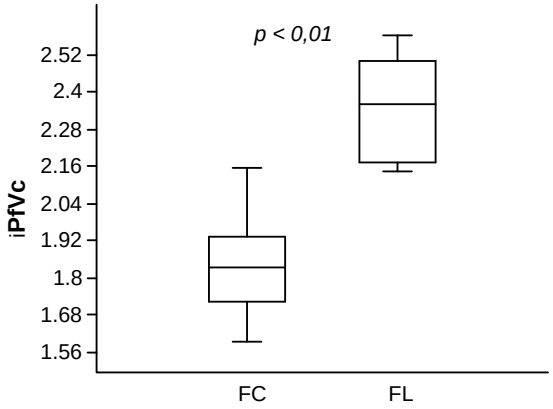

Figura 18 - Intensidade da Proliferação Vascular (iPfVc)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.1.2 Proliferação fibroblástica (PfFb) - Fibroplasia

As médias das classificações obtidas por animal e a organização dos dados na avaliação da intensidade de proliferação fibroblástica, são mostradas nos apêndices 3 e 4 (ver em Apêndices). No grupo Controle, a fibroplasia foi considerada moderada em cinco feridas e regular em uma. No grupo Lactoferrina foi classificada como regular em cinco feridas e acentuada em uma (ver Tabela 2). Houve diferença significante a favor do Grupo Lactoferrina (FL) com $p < 0,01$, conforme pode se observar na Figura 19 e na Tabela 5. As figura 24 e 25 mostram uma das lâminas do grupo Controle (FC) e uma do grupo Lactoferrina (FL), respectivamente.

Tabela 2 - Classificação da proliferação fibroblástica (Teste de Mann-Whitney)

	nFC	nFL
ínfimo	0	0
moderado	5	0
regular	1	5
acentuado	0	1

nFC = número de Feridas Controle ; nFL = número de Feridas Lactoferrina

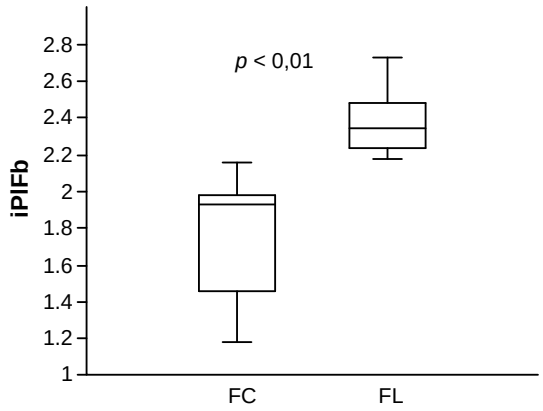

Figura 19 - Intensidade de Proliferação Fibroblástica (iPfFb)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.1.3 Colagenização (Clg)

As médias das classificações obtidas por animal e a organização dos dados na avaliação da intensidade de deposição de colágeno, são mostradas nos apêndices 5 e 6 (ver em Apêndices). No grupo Controle, a colagenização foi considerada moderada em seis feridas. No grupo Lactoferrina foi classificada como moderada em uma ferida, regular em três e acentuada em duas feridas (ver Tabela 3). Houve diferença significante a favor do Grupo Lactoferrina (FL) com $p < 0,01$, conforme pode se observar na Figura 20 e na Tabela 5. Na figura 26 pode-se observar a colagenização de umas das lâminas do grupo Controle (FC) e na Figura 27 uma do grupo Lactoferrina (FL)

Tabela 3 - Classificação da colagenização (Teste de Mann-Whitney)

	nFC	nFL
ínfimo	0	0
moderado	6	1
regular	0	3
acentuado	0	2

nFC = número de Feridas Controle ; nFL = número de Feridas Lactoferrina

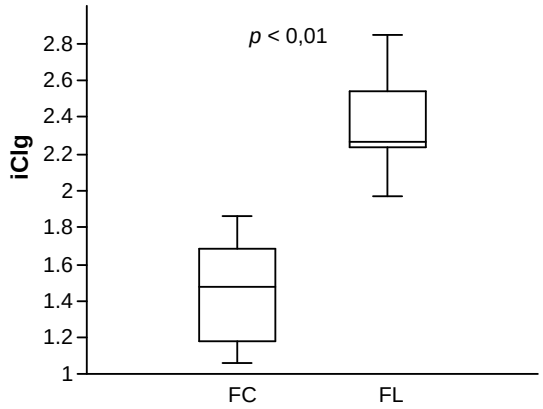

Figura 20 - Intensidade de Colagenização (iClg)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.1.4 Reepitelização (Rpt)

As médias das classificações obtidas por animal e a organização na avaliação da intensidade de regeneração da epiderme, são mostradas nos apêndices 7 e 8 (ver em Apêndices). No grupo Controle, a reepitelização foi considerada ínfima em cinco feridas e moderada em uma. No grupo Lactoferrina foi classificada como moderada em cinco feridas e regular em uma (ver Tabela 4). Houve diferença significante a favor do Grupo Lactoferrina (FL) com $p < 0,01$, conforme pode se observar na Figura 21 e na Tabela 5.

A figura 28 mostra uma das lâminas do grupo Lactoferrina (FL)

Tabela 4 – Classificação da reepitelização (Teste de Mann-Whitney)

	nFC	nFL
ínfimo	5	0
moderado	1	5
regular	0	1
acentuado	0	0

nFC = número de Feridas Controle e nFL = número de Feridas Lactoferrina

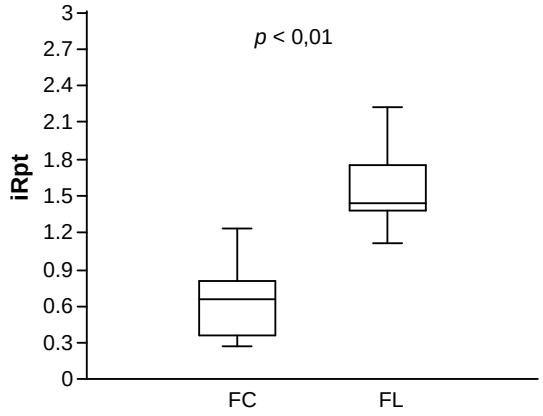

Figura 21 - Intensidade de Reepitelização (iRpt)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

Tabela 5 – Intensidades dos parâmetros das lâminas coradas por H.E e T.M

Parâmetros	**Grupo**	**N**	**Md ± sd**	**Valor de *p***
Proliferação Vascular	FC	6	1,84 ± 0,19	**< 0,01**
	FL	6	2,35 ± 0,17	
Proliferação Fibroblástica	FC	6	1,74 ± 0,36	**< 0,01**
	FL	6	2,37 ± 0,20	
Colagenização	FC	6	1,45 ± 0,29	**< 0,01**
	FL	6	2,35 ± 0,30	
Reepitelização	FC	6	0,63 ± 0,29	**< 0,01**
	FL	6	2,35 ± 0,30	

Md ± sd = médias das intensidades encontradas pelos tres observadores ± desvio padrão
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

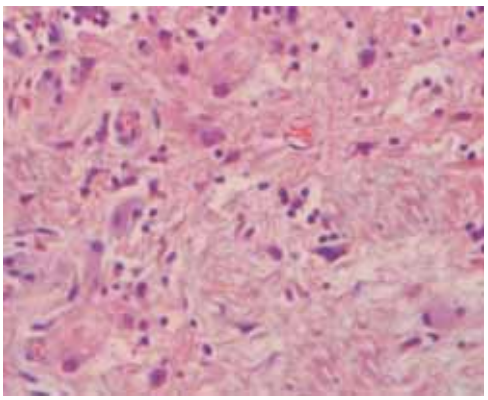

Figura 22 - Fotomicrografia de Proliferação Vascular grupo FC; H.E, (100X).

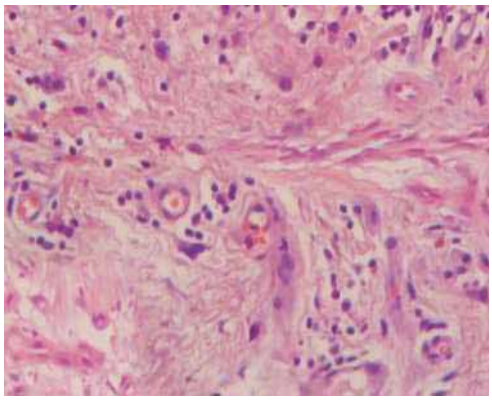

Figura 23 - Fotomicrografia de Proliferação Vascular grupo FL; H.E, (100X). Paredes dos vasos já melhores definidas.

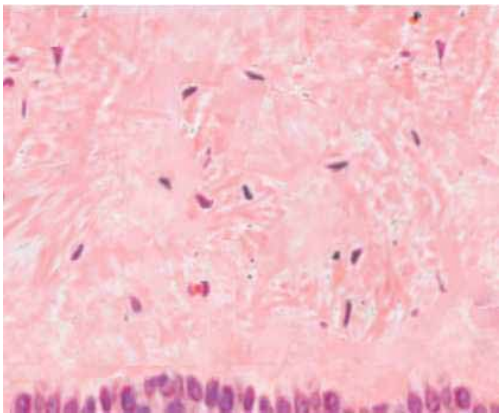

Figura 24 - Fotomicrografia de Proliferação Fibroblástica grupo FC; H.E, (100X).

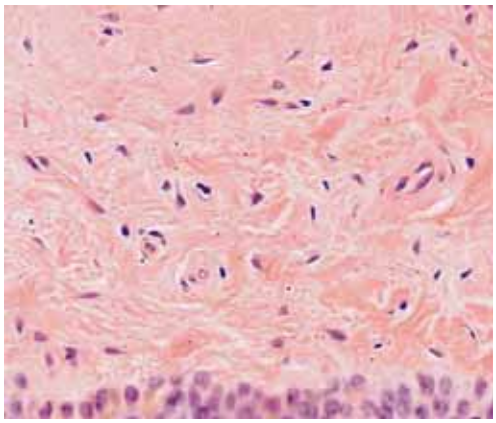

Figura 25 - Fotomicrografia de Proliferação Fibroblástica grupo FL; H.E, (100X.

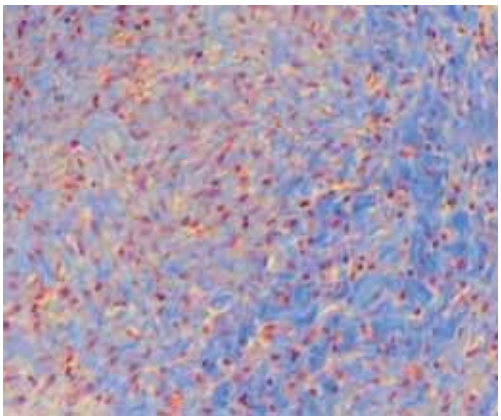

Figura 26 - Fotomicrografia da Colagenização grupo FC fibrilas colágenas em azul; T.M (100X).

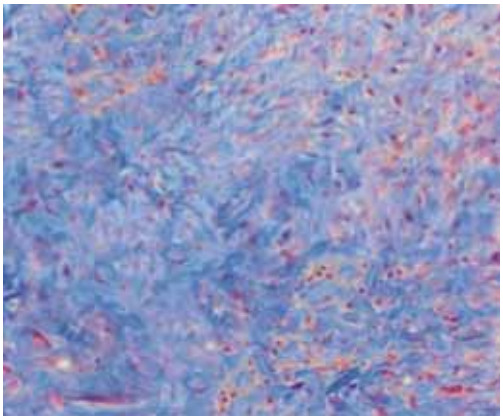

Figura 27 - Fotomicrografia da Colagenização grupo FL fibrilas colágenas em azul; T.M (100X).

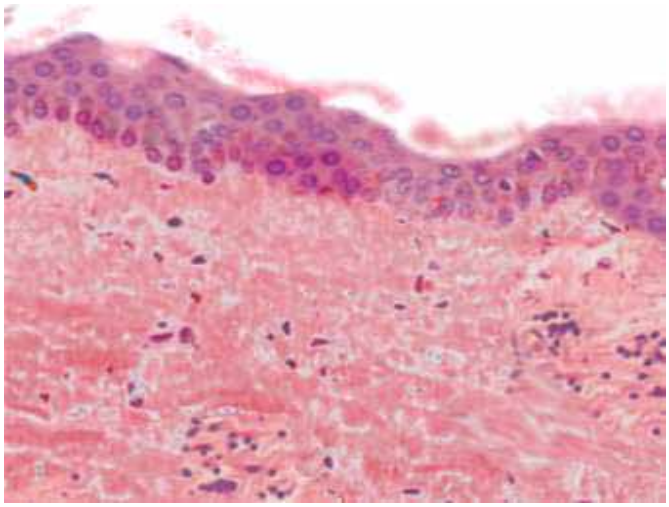

Figura 28 - Fotomicrografia da Reepitelização grupo FL; H.E (100X)

6.1.2 Resultados dos parâmetros histológicos quanto à: percentagem de células polimorfonucleares e células mononucleares.

6.1.2.1 Células Polimorfonucleares (Pn)

As médias das percentagens de células polimorfonucleares presentes, estão mostradas no apêndice 9 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença significante a favor do grupo controle (FC) com ***p*** < 0,001, conforme se pode observar Figura 29 e na Tabela 6. A Figura 33 mostra a infiltração de polimorfonucleares em uma ferida do grupo Controle (FC).

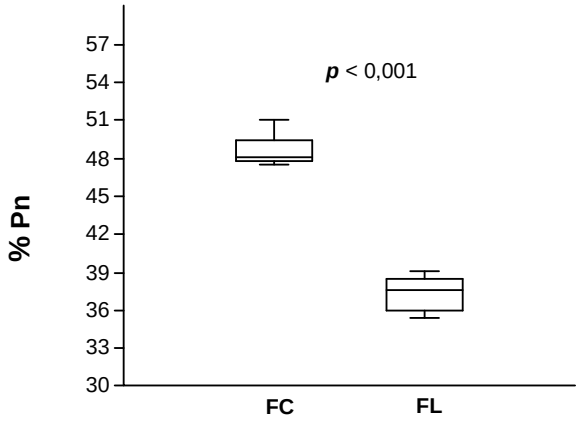

Figura 29 **-** Percentagem de Polimorfonucleares (% Pn)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

6.1.2.2 Células Mononucleares (Mn)

As médias das percentagens de células mononucleares presentes, estão mostradas no apêndice 9 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença significante a favor do grupo Lactoferrina (FL) com ***p*** < 0,001, conforme se pode observar Figura 30 e na Tabela 6. A Figura 34 mostra a infiltração de mononucleares em uma ferida do grupo Lactoferrina (FL).

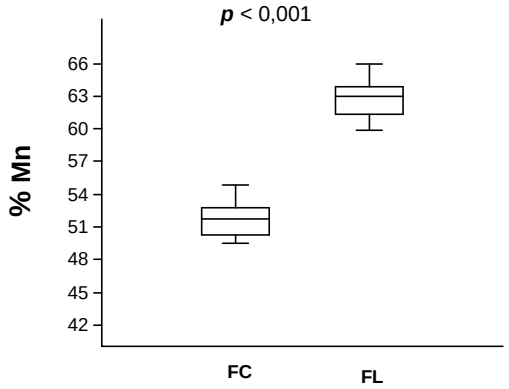

Figura 30 **-** Percentagem de Mononucleares (% Mn)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

Tabela 6 – Percentagem (%) de leucócitos observados no processo de reparação tecidual (ANOVA)

Leucócitos	Grupo	N	Md (%) ± sd	**Valor de *p***
Polimorfonucleares	FC	6	48,52 ± 1,28	***< 0,001***
	FL	6	37,30 ± 1,43	
Mononucleares	FC	6	51,66 ± 1,79	***< 0,001***
	FL	6	62,75 ± 1,98	

Md (%) ± sd = médias das percentagens ± desvio padrão
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

6.1.2.3 Relação Polimorfonucleares versus Mononucleares.

A relação entre os números de polimorfonucleares e mononucleares em percentagem, mostrou diferença pouco significante no grupo Controle (FC) com ***p*** < 0,05. Já

para o grupo Lactoferrina (FL) a diferença foi bastante significante, com ***p*** < 0,001. Os resultados estão mostrados na Tabela 7 e nos Gráficos 31 e 32. .

Tabela 7 – Relação entre as percentagens de polimorfonucleares e mononucleares

Leucócitos	Grupo	N	Md (%) ± sd	**Valor de *p***
Polimorfonucleares vs Mononucleares	FC	6	48,52 ± 1,28 51,66 ± 1,79	**< 0,05**
Polimorfonucleares vs, Mononucleares	FL	6	37,30 ± 1,43 62,75 ± 1,98	**< 0,001**

Md (%) ± sd = médias das percentagens ± desvio padrão
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

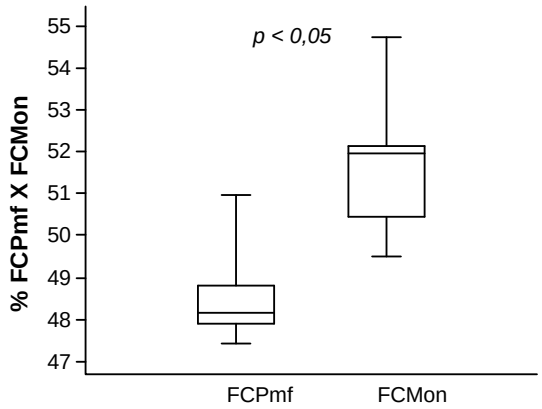

Figura 31 **–** Percentagem (%) de Polimorfonucleares (Pn) x Mononucleares (Mn) no grupo Controle (FC). FC = Ferida Controle.

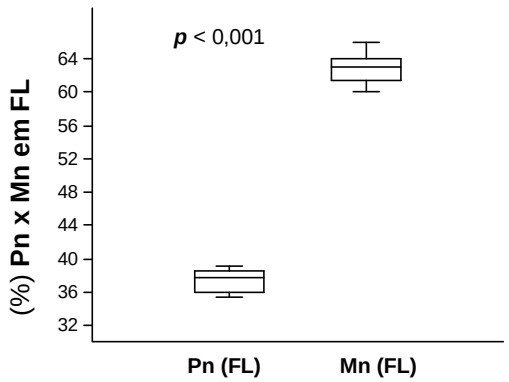

Figura 32 **–** Percentagem (%) de Polimorfonucleares (Pn) x Mononucleares (Mn) no grupo Controle (FL). FL = Ferida Lactoferrina.

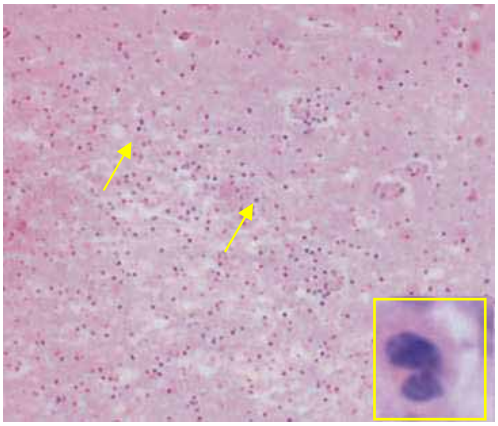

Figura 33 - Polimorfonucleares do grupo FC; H.E. (40X). Neutrófilo (setas) e no destaque. (Fotomicrografia)

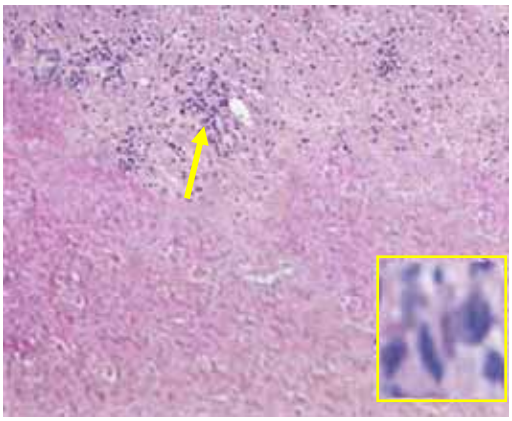

Figura 34 – Mononucleares; do grupo FL; H.E (40X). Grupo de macrófagos (seta) e em destaque. (Fotomicrografia).

6.1.3 Resultados da Histoquímica (*picrosirius-red)* para Colágeno

6.1.3.1 Percentagem (%) da deposição do Colágeno tipo I (Cg-I)

As médias das percentagens da deposição do Colágeno tipo I estão mostradas no apêndice 10 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença significante a favor do grupo Lactoferrina (FL) com ***p*** < 0,01, conforme se pode observar no Figura 35 e na Tabela 8.

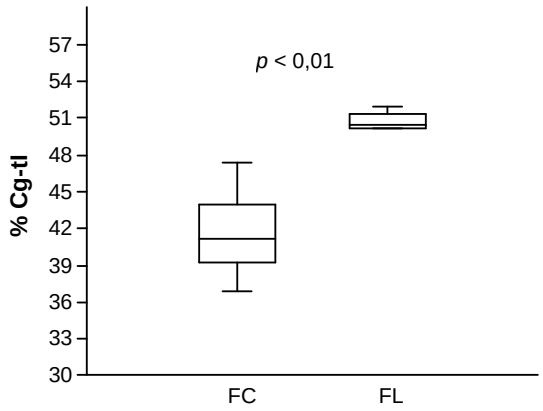

Figura 35 **-** Percentagem (%) do Colágeno Tipo I (Cg-tI)
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.3.2 Percentagem (%) da deposição do Colágeno tipo III (Cg-tIII)

As médias das percentagens da deposição do Colágeno tipo III estão mostradas no apêndice 10 (ver Apêndices). Os resultados não mostraram diferença significante entre os grupos Controle (FC) e Lactoferrina (FL) com ***p*** > 0,05, conforme se pode observar no Figura 36 e na Tabela 8.

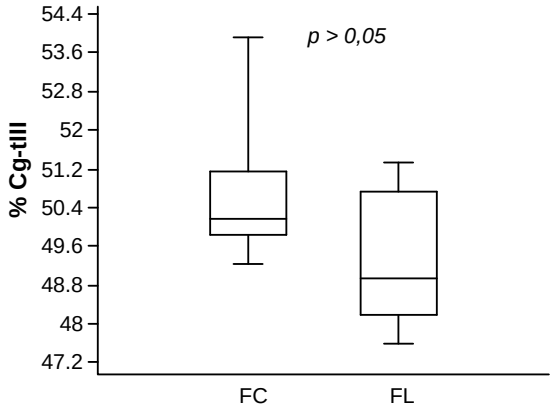

Figura 36 – Percentagem (%) de Colágeno Tipo III (Cg-tIII).
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.3.3 Índice da Maturação do Colágeno (IMaC)

As médias do índice da maturação do colágeno (IMaC) estão mostradas no apêndice 10 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença significante a favor do grupo Lactoferrina (FL) com ***p*** < 0,01, conforme se pode observar na Figura 37 e na Tabela 8. A Figura 38 mostra a deposição dos colágenos tipo I e III evidenciados pelo Picrosirius-red.

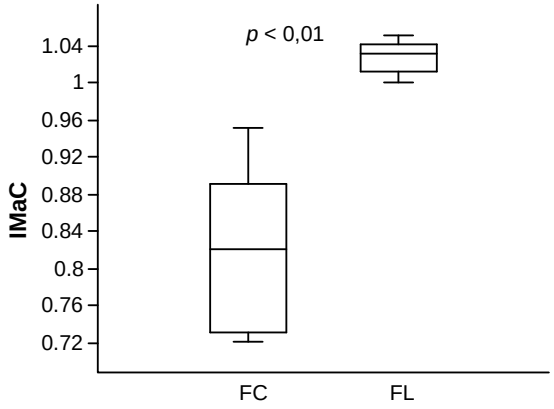

Figura 37 - Índice de Maturação do Colágeno (IMac).
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina

Tabela 8 – Percentagem (%) da deposição do colágeno tipo I, do tipo III e IMaC

Parametros	Grupo	N	Md (%) ± sd	Valor de ***p***
Colágeno tipo I (%)	FC	6	41,39 ± 3.53	**< 0,01**
	FL	6	50,65 ± 1,14	
Colágeno tipo III (%)	FC	6	50,71 ± 1,68	**> 0,05**
	FL	6	49,26 ± 1,45	
IMac	FC	6	37,30 ± 1,43	**< 0,01**
	FL	6	62,75 ± 1,98	

Md (%) ± sd = médias das percentagens ± desvio padrão; FC = Ferida Controle
FL = Ferida Lactoferrina; IMaC = Índice de maturação do colágeno

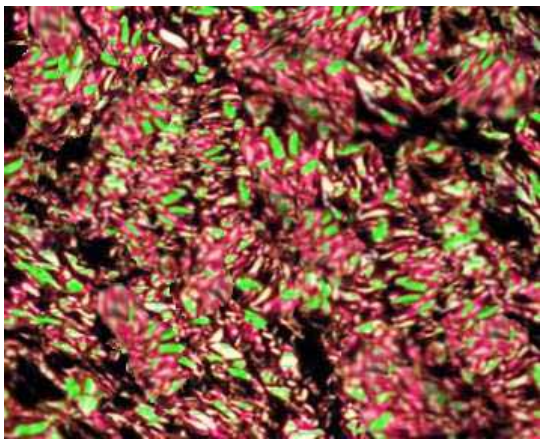

Figura 38 – Colágenos tipo I (vermelho) e
tipo III (verde); Picrosirius-red (100X + zoon).

6.1.4 Resultados da Imunohistoquímica

6.1.4.1 Número de Miofibroblastos

As médias do número de miofibroblastos estão mostradas no apêndice 11 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença bastante significante a favor do grupo Lactoferrina (FL) com ***p*** < 0,001, conforme se pode observar no Figura 39 e na Tabela 9.

A Figura 41 mostra um campo com miofibroblastos para contagem.

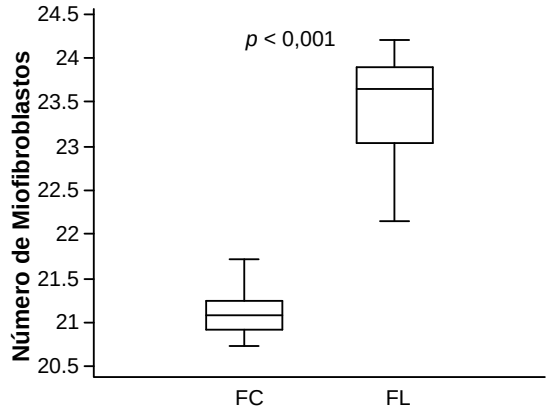

Figura 39 – Número de Miofibroblastos.
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

6.1.4.2 Área dos Miofibroblastos

As médias das áreas dos miofibroblastos estão mostradas no apêndice 12 (ver Apêndices). Os resultados mostraram diferença bastante significante a favor do grupo Lactoferrina (FL) com ***p*** < 0,001, conforme se pode observar no Figura 40 e na Tabela 9.

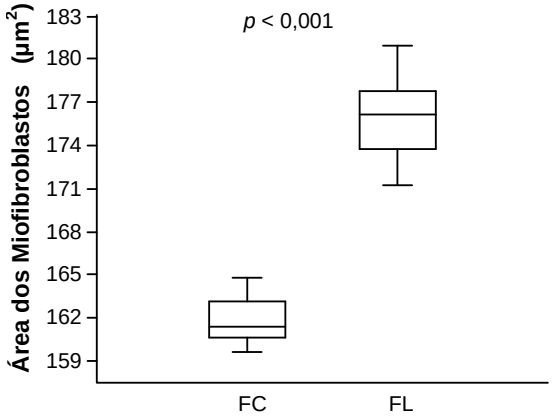

Figura 40 – Área dos Miofibroblastos (μm^2).
FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina.

Tabela 9 – Número e Área dos Miofibroblastos (Mfb)

Parametros	Grupo	N	Md ± sd	Valor de ***p***
Número de Mfb	FC	6	21,09 ± 0,27	***< 0,001***
	FL	6	23,37 ± 0,61	
Área dos Mfb (μm^2)	FC	6	161,74 ± 4,43	***< 0,001***
	FL	6	175,93 ± 6,61	

Md ± sd = médias ± desvio padrão; FC = Ferida Controle; FL = Ferida Lactoferrina
Mfb = Miofibroblastos

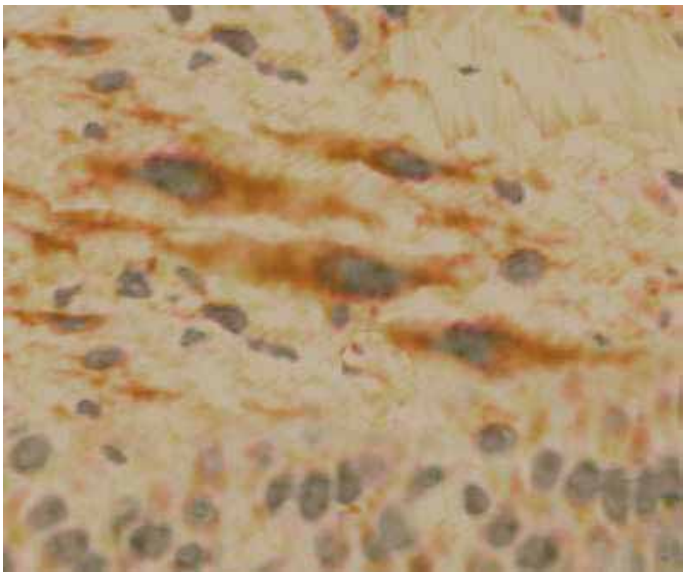

Figura 41 - Campo de lâmina do grupo FL com miofibroblastos para contagem; imunohistoquímica (400X + zoon). (Fotomicrografia)

6.1.5 Resultado da morfometria das feridas cirúrgicas

6.1.5.1 Área das Feridas (mm^2)

As áreas das feridas diminuíram gradativamente com a evolução do tempo. A média e o desvio padrão para cada grupo estão demonstrados na Tabela 10 e representados na Figura 42.

Quando os grupos foram comparados, as médias das áreas apresentaram diferença bastante significativa, a favor da Lactoferrina (FL) no que diz respeito ao menor tamanho em relação ao tempo, com $p < 0,001$.

Tabela 10 - Médias das áreas (mm^2) das feridas nos 10 dias.

	DIAS										*p*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
MAFL	**78.68**	**76.89**	**74.50**	**72.91**	**64.35**	**45.89**	**30.03**	**12.52**	**6.08**	**0.98**	
± sd	0.96	0.66	0.90	0.62	0.49	0.56	0.32	0.73	0.38	0.53	***< 0,001***
MAFC	**78.47**	**76.74**	**75.74**	**74.59**	**72.21**	**61.40**	**52.48**	**30.52**	**14.31**	**6.50**	
± sd	0.79	0.52	0.74	0.74	0.56	0.80	0.83	0.68	0.42	0.63	

MAFL = médias das áreas das feridas Lactoferrina (FL)
MAFC = médias das áreas das feridas Controle (FC)
± sd = ± desvio padrão

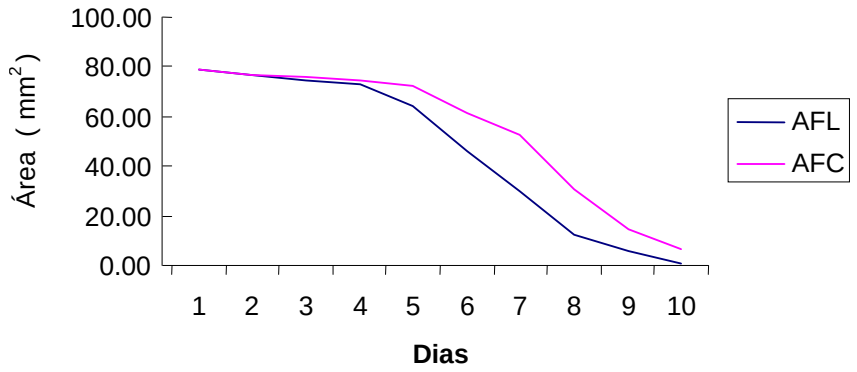

Figura 42 - Áreas das Feridas (mm^2)
AFL = Área das feridas Lactoferrina; AFC = Área das feridas Controle

6.1.5.2 Percentagem (%) de contração das feridas cirúrgicas

Para o cálculo da percentagem de contração das feridas utilizou-se a equação proposta por RAMSEY et al, (1995).

Equação 2 - Percentagem da Contração (PCt).

$$(PCt) = 100 \times (F_0 - F_i)/ F_0$$

onde F_0 é o valor inicial da área da lesão e F_i o valor da área nos dias de mensuração.

A comparação entre os grupos mostrou diferença altamente significante ao grupo FL, com **p** < 0,001. A média e o desvio padrão para cada grupo estão demonstrados na Tabela 11 e representados no Figura 43.

Tabela 11 - Médias das percentagens (%) das contrações das feridas nos 10 dias.

	DIAS										*p*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
MPCt-FL	0.00	2.27	5.31	7.33	18.21	41.67	61.83	84.09	92.27	98.76	
± sd	0.00	0.47	0.32	0.43	0.55	0.49	0.21	0.76	0.40	0.67	***< 0,001***
MPCt-FC	0.00	2.20	3.48	4.94	7.97	21.75	33.12	61.11	81.76	91.72	
± sd	0.00	1.13	0.95	1.33	1.25	0.93	1.41	0.65	0.59	0.85	

MPCt-FL = médias das percentagens de contração das feridas Lactoferrina (FL)

MPCt-FC = médias das percentagens de contração das feridas Lactoferrina (FC)

± sd = ± desvio padrão

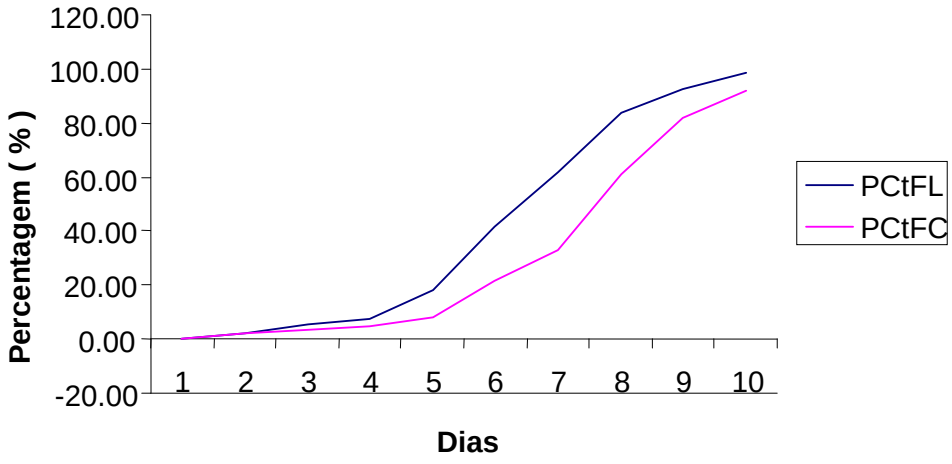

Figura 43 - Percentagem (%) de Contração das Feridas.

PCt FL = Percentagem de contração das feridas Lactoferrina

PCt FC = Percentagem de contração das feridas Controle

6.1.6 Análises de Regressão e Correlação

Dentre essas análises, as que mostraram importante e significante relação foram as do número de miofibroblastos do grupo das feridas que receberam a Lactoferrina (FL), quanto às intensidades de colagenização e de reepitelização e, percentagem da deposição do colágeno Tipo I.

6.1.6.1 Intensidade de Colagenização vs Número de Miofibroblastos (NMf)

Para a colagenização o Coeficiente de Determinação (r^2) foi de 0,90 e Coeficiente de Correlação (r) 0,95, ambos próximo de 1,0 indicando relação bastante alta. (Figura 44)

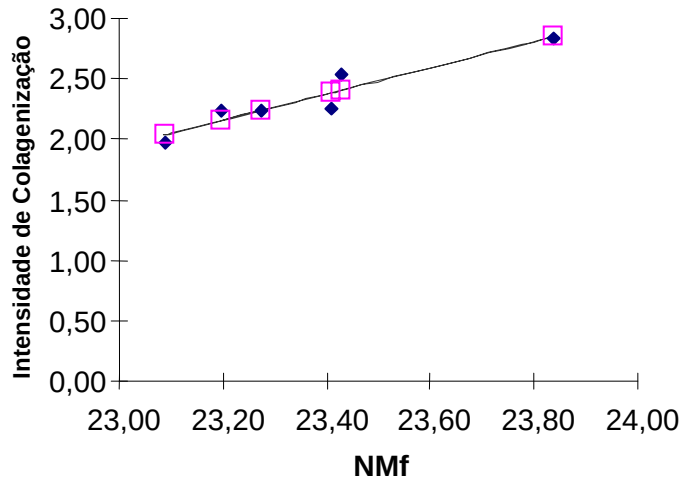

Figura 44 – Intensidade de Colagenização vs Número de Miofibroblastos (NMf) do grupo FL (Ferida Lactoferrina)

6.1.6.2 Intensidade de Reepitelização vs Número de Miofibroblastos (NMf)

Para reepitelização o Coeficiente de Determinação (r^2) foi de 0,91 e Coeficiente de Correlação (r) 0,95, ambos próximo de 1,0 indicando relação bastante alta. (Figura 45)

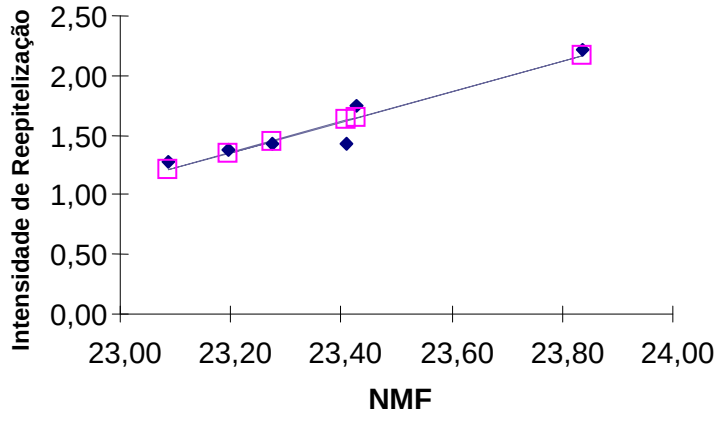

Figura 45 – Intensidade de Reepitelização vs Número de Miofibroblastos (NMf) do grupo FL (Ferida Lactoferrina.

6.1.6.3 Percentagem de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos (NMf)

Para o Colágeno Tipo I o Coeficiente de Determinação (r^2) foi de 0,83 e Coeficiente de Correlação (r) 0,91, ambos próximo de 1,0 indicando relação bastante alta. (Figura 46)

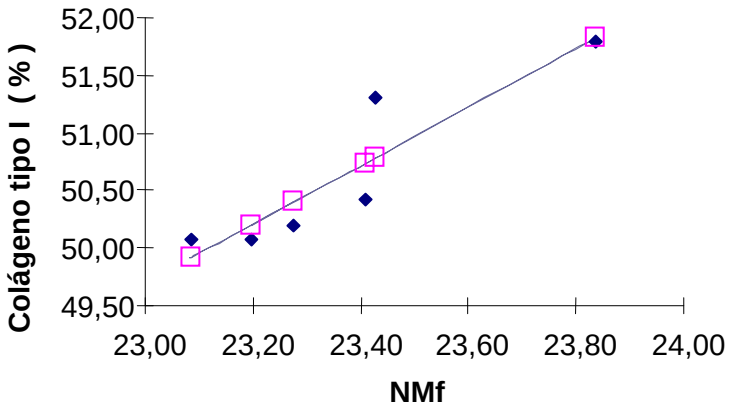

Figura 46 – Percentagem de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos (NMf) do grupo FL (Ferida Lactoferrina).

6.2 Resultados do Experimento II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia induzida em intestino delgado de ratos.

6.2.1 Peso dos animais (g)

O Apêndice 13 (ver em Apêndices) mostra as médias dos pesos dos ratos dos grupos que receberam as rações: Caseína isoladamente (Ci); Soja isoladamente (Si); Caseína com Lactoferrina (CL); e Soja com Lactoferrina (SL), durante 15 dias.

O Teste t de Student, mostrou que as médias no primeiro dia foram semelhantes nos quatro grupos, com $p > 0,05$.

No quinto dia houve diferença bastante significante entre os grupos "Ci e Si" a favor do grupo Caseína, com $p < 0,001$. Entre os grupos "CL e SL" também houve diferença a favor do grupo Caseína, com $p = 0,001$. A comparação entre os grupos "SL e Si", mostrou,

diferença significante, a favor do grupo com Lactoferrina, com $p < 0,05$. Entre os grupos "Ci e SL" a comparação foi favorável ao grupo Caseína, com $p = 0,001$. Já, entre os grupos "CL e Ci", não houve diferença significante.

No décimo dia as comparações entre os grupos: "CL e SL"; "Ci e SL"; e "CL e Ci" não mostraram diferença significante. Entre os grupos "Ci e Si" a diferença foi favorável ao grupo Caseína, com $p < 0,001$. Os grupos "SL e Si " mostraram diferença bastante significante a favor do grupo Lactoferrina, com $p < 0,001$.

No décimo quinto dia houve diferença significante entre os grupos "Ci e Si", favorável ao grupo Caseína, com $p < 0,001$. A comparação entre os grupos "SL e Si" mostrou diferença bastante significante a favor da Lactoferrina, com $p < 0,001$. Não houve diferença nas comparações entre os grupos: "CL e Ci"; "CL e SL" ; e "Ci e SL".

A variação média dos pesos entre os grupos está expressa na Tabela 12 e nos Figuras 47 e 48.

Tabela 12 - Variação média dos pesos (g)

Grupo	*PA5*	Val. de *p*	*PA10*	Val. de *p*	*PA15*	Val. de *p*
SL	128,15 ± 1,01	**0,001**	142,84 ± 1,15	0,134	154,89 ± 1,24	> 0,05
CL	133,22 ± 1,30		145,38 ± 1,42		155,42 ± 1,52	
Si	125,83 ± 1,05	**0,0001**	134,38 ± 0,91	**5,43E-06**	140,11 ± 1,17	**< 0,001**
Ci	131,75 ± 0,65		144,96 ± 0,72		155,01 ± 0,77	
SL	128,15 ± 1,01	**0,01**	142,84 ± 1,15	**2,65E-06**	154,89 ± 1,24	**< 0,001**
Si	125,83 ± 1,05		134,38 ± 0,91		140,11 ± 1,17	
CL	133,22 ± 1,30	0,110	145,38 ± 1,42	0,634	155,42 ± 1,52	> 0,05
Ci	131,75 ± 0,65		144,96 ± 0,72		155,01 ± 0,77	
Ci	131,75 ± 0,65	**0,001**	144,96 ± 0,72	0,119	155,01 ± 0,77	> 0,05
SL	128,15 ± 1,01		142,84 ± 1,15		154,89 ± 1,24	

PA5, PA10 e PA15 = médias dos pesos dos animais em gramas, no 5^o, 10^o e 15^o dias respectivamente

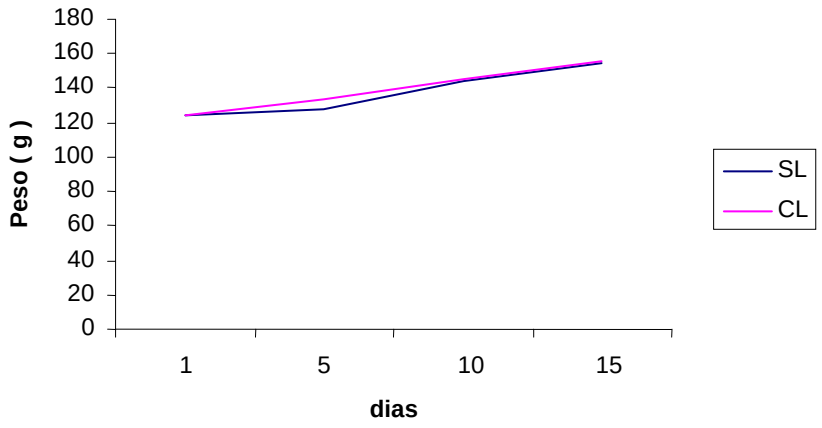

Figura 47 – Comparação do Peso (g) dos animais entre grupos:
SL = Soja mais Lactoferrina ; CL = Caseína mais Lactoferrina

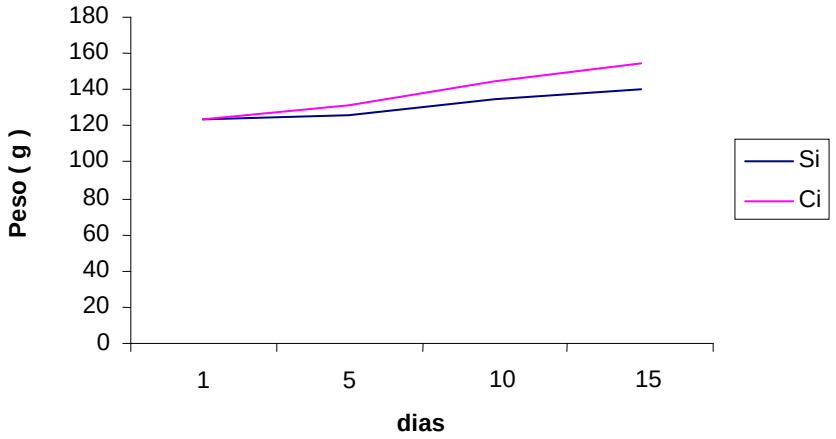

Figura 48 - Comparação do Peso (g) dos animais entre os grupos:
Si = Soja sem Lactoferrina ; Ci = Caseína sem Lactoferrina

6.2.2 Histomorfometria da Mucosa Intestinal

6.2.2.1 Comprimento (Altura) das Vilosidades (CV)

A mensuração em micrômetros (µm), do comprimento das vilosidades (CV), nas lâminas histológicas, realizada através do software ImageJ, dos grupos: “Caseína mais Lactoferrina” (CL); “Caseína sem Lactoferrina” (Ci); “Soja mais Lactoferrina” (SL); e “Soja sem Lactoferrina” (Si) tem suas médias mostradas no Apêndice 14 (ver Apêndices) .

A análise estatística “ANOVA” para os comprimentos das vilosidades (CV) na comparação entre os grupos “Ci e Si”, obteve um valor $p < 0,001$, mostrando que a diferença dos comprimentos das vilosidades entre as duas fontes protéicas é, de um modo bastante alto, significantemente maior para o animais alimentados com caseína, como se pode observar na Figura 49.

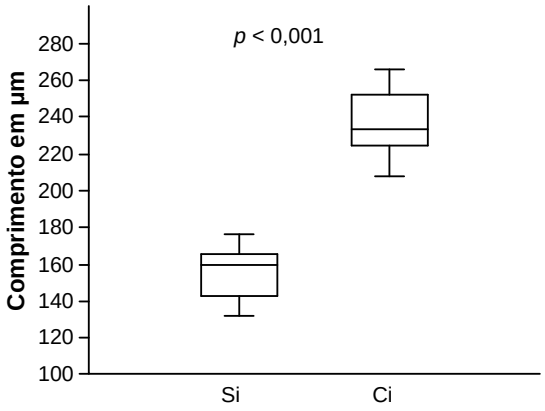

Figura 49 – Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre os grupos Ci e Si. Si = grupo Soja sem Lactoferrina; Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina.

A comparação entre os grupos “CL e SL” mostrou diferença bastante significante para o grupo de animais alimentados com ração “Caseína mais Lactoferrina”, com $p < 0,001$, como mostra a Figura 50.

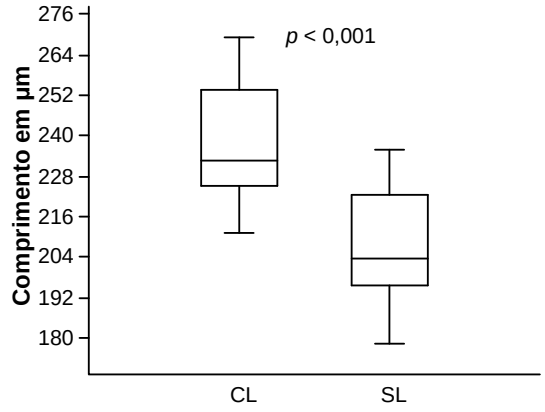

Figura 50 – Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre os grupos CL e SL. CL = grupo Caseína com Lactoferrina; SL = grupo Soja com Lactoferrina.

Também a comparação entre os grupos “SL e Si” mostrou diferença bastante alta, significantemente maior, para os animais que receberam suplementação de Lactoferrina, com $p < 0,001$, como se pode observar na Figura 51. As Figuras 54 e 55 mostram a mensuração de vilosidade do grupo SL e Si, respectivamente.

Os grupos “Ci e SL” mostraram diferença significante, favoravelmente à Caseína, com um valor de $p < 0,001$, mostrado na Figura 52. Já, na comparação entre os grupos: “Ci e CL” , não foi mostrada diferença significante, mostrado na Figura 53.

As comparações entre os grupos estão expressas na Tabela 13.

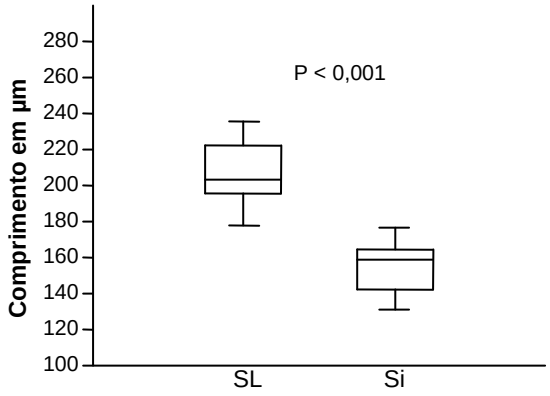

Figura 51 – Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre os grupos SL e Si.
SL = grupo Soja com Lactoferrina; Si = grupo Soja sem Lactoferrina.

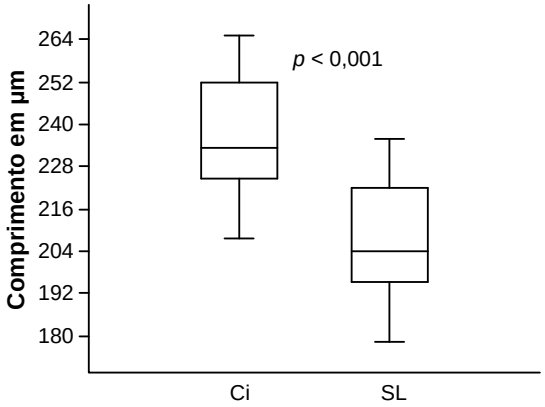

Figura 52 – Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre os grupos Ci e SL
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina; SL = grupo Soja com Lactoferrina.

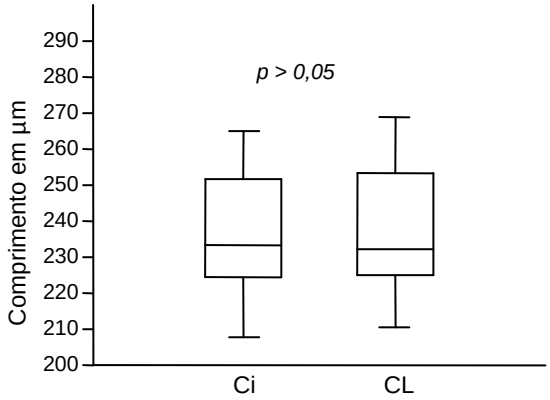

Figura 53 – Comparação do comprimento das vilosidades (µm) entre os grupos Ci e CL. Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina; CL = grupo Caseína com Lactoferrina

Tabela 13 - Variação média do comprimento das vilosidades (CV) em µm.

Grupos	*MCV* ± SD	Val. de *p*
SL	205,75 ± 32,95	***< 0,001***
CL	236,73 ± 33,32	
Si	154,49 ± 31,87	***< 0,001***
Ci	235,30 ± 32,95	
SL	205,75 ± 32,95	***< 0,001***
Si	154,49 ± 31,87	
Ci	235,30 ± 32,95	***< 0,001***
SL	205,75 ± 32,95	
CL	236,73 ± 33,32	*> 0,05*
Ci	235,30 ± 32,95	

MCV = médias do comprimento das vilosidades (CV) ± Desvio Padrão, dos grupos de animais

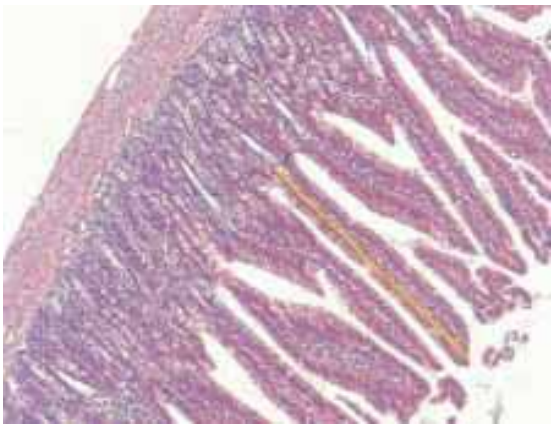

Figura 54 - Demarcação de vilosidade do grupo SL, no software ImageJ. (40x)

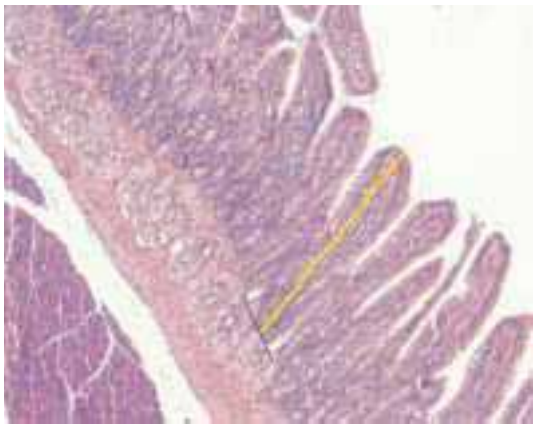

Figura 55 - Demarcação de vilosidade do grupo Si, no software ImageJ. (40X)

6.2.2.2 Profundidade das Criptas (PC)

A mensuração, em micrômetros (µm), da profundidade das criptas (PC), nas lâminas histológicas, realizada através do software ImageJ, dos grupos: “Caseína mais Lactoferrina” (CL); Caseína isoladamente (Ci); “Soja mais Lactoferrina” (SL); e Soja isoladamente (Si) tem suas médias mostradas no Apêndice 15 (ver Apêndices).

A análise estatística ANOVA mostrou que a comparação entre os grupos “Ci e Si”, foi bastante significante, para o grupo Soja com valor ***p*** < 0,001, como mostrado na Figura 56. Isso indica que a diferença das profundidades das criptas entre as duas fontes protéicas é, de um modo bastante alto, significantemente maior para o animais alimentados com soja.

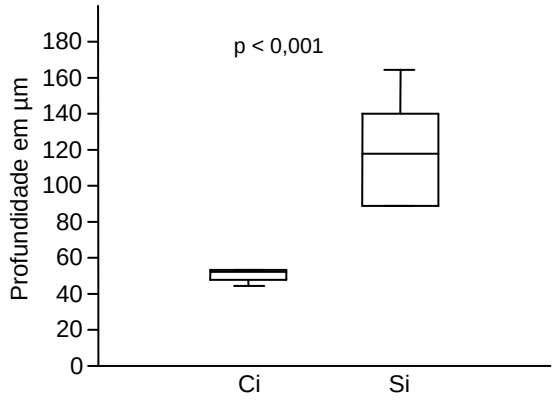

Figura 56 – Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e Si
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina; SL = grupo Soja com Lactoferrina

A comparação entre os grupos “SL e Si”, mostrou diferença significantemente maior para os animais alimentados com Soja sem suplementação de Lactoferrina, com o valor de ***p*** < 0,001, podendo ser visto na Figura 57. Já, as comparações entre os grupos: “CL e SL”; “CL e Ci”; e “Ci e SL” não mostraram diferença significante, como se pode observar, respectivamente, nas Figuras 58, 59 e 60..

As comparações entre os grupos estão expressas na Tabela 14.

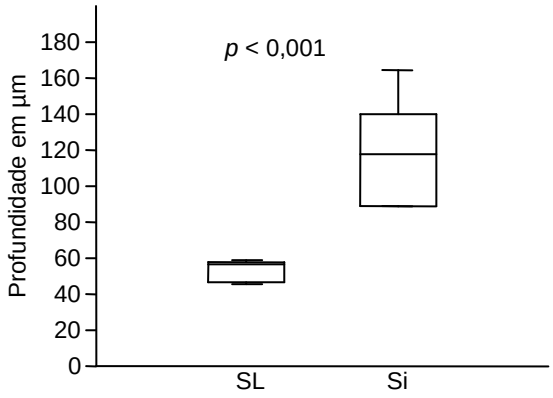

Figura 57 – Comparação da profundidade das criptas (µm) entre SL e Si.
SL = grupo Soja com Lactoferrina; Si = grupo Soja sem Lactoferrina

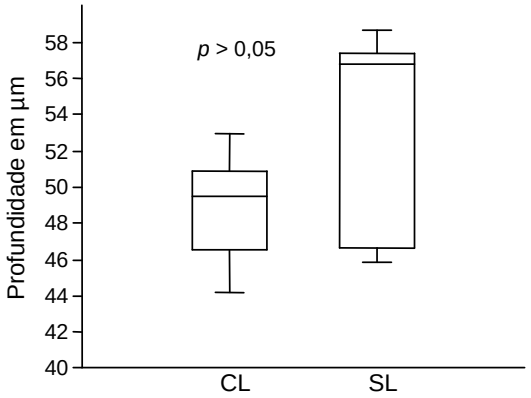

Figura 58 – Comparação da profundidade das criptas (µm) entre CL e SL.
SL = grupo Soja com Lactoferrina; Si = grupo Soja sem Lactoferrina

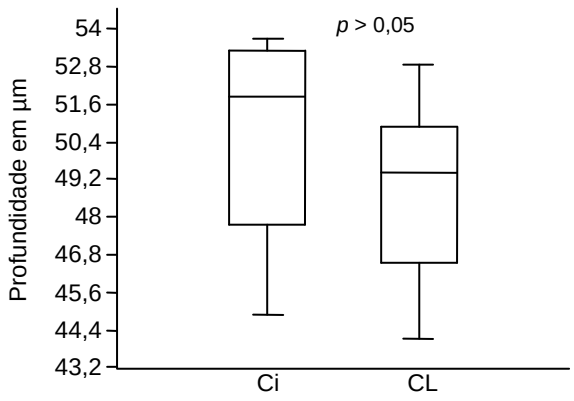

Figura 59 – Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e CL.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina; CL = grupo Caseína com Lactoferrina

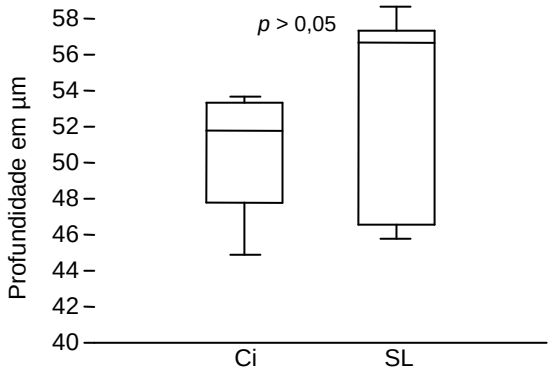

Figura 60 – Comparação da profundidade das criptas (µm) entre Ci e SL.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina; SL = grupo Soja com Lactoferrina

Tabela 14 - Variação média da profundidade das criptas (PC) em µm

Grupos	*MPC* ± SD	Val. de *p*
SL	52,83 ± 11,98	*> 0,05*
CL	48,73 ± 11,80	
Si	116,94 ± 37,57	***< 0,001***
Ci	50,34 ± 11,98	
SL	52,83 ± 11,98	***< 0,001***
Si	116,94 ± 37,57	
CL	48,73 ± 11,80	*> 0,05*
Ci	50,34 ± 11,98	
Ci	50,34 ± 11,98	> 0,05
SL	52,83 ± 11,98	

MPC = médias da profundidade das criptas (PC) ± Desvio Padrão, dos grupos de animais

6.2.3 Avaliação dos Miofibroblastos da Pericripta Intestinal

6.2.3.1 Número de Miofibroblastos (NMf)

As médias dos números de miofibroblastos, por animal, podem ser visualizadas no Apêndice 16 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e Si” não mostrou diferença significante, indicando que o tipo de dieta protéica não interfere no número de miofibroblastos, como se pode observar na Figura 61 e Tabela 15.

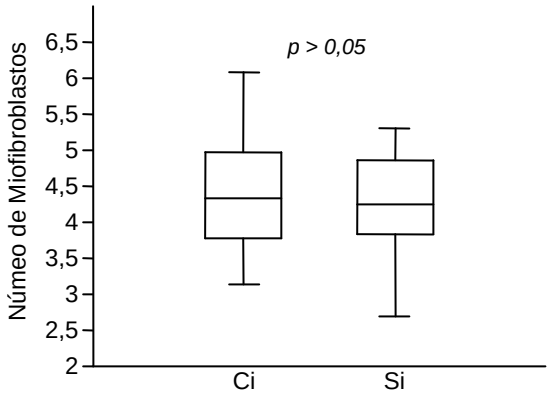

Figura 61 – Comparação do número de Miofibroblastos entre Ci e Si.
Ci = Grupo Caseína sem Lactoferrina ; Si = Grupo Soja sem Lactoferrina

Comparando-se os grupos “CL e SL” e os grupos “Ci e SL” obteve-se um valor ***p*** < 0,001, mostrando diferença bastante significante quando se suplementa a dieta de soja com Lactoferrina, resultados que se pode observar nas Figuras 62 e 63, respectivamente, e na Tabela 15.

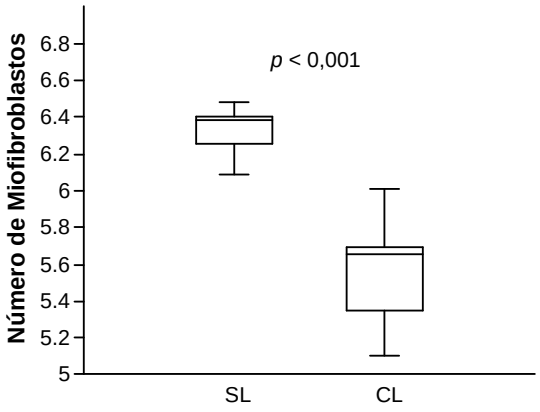

Figura 62– Comparação do número de Miofibroblastos entre CL e SL.
Cl = Grupo Caseína com Lactoferrina ; SL = Grupo Soja com Lactoferrina

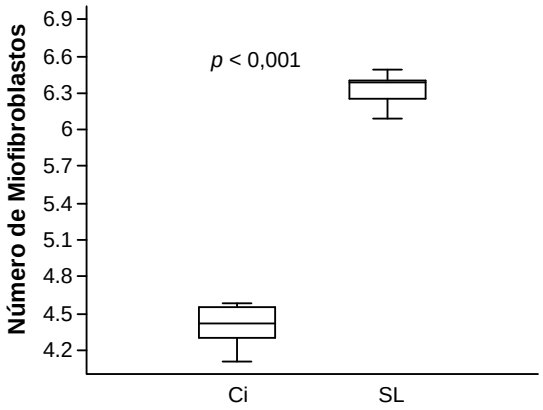

Figura 63 – Comparação do número de Miofibroblastos entre Ci e SL.
Ci = Grupo Caseína sem Lactoferrina ; SL = Grupo Soja com Lactoferrina.

Para o mesmo tipo de dieta, com e sem adição da Lactoferrina obteve-se na comparação entre "SL e Si" um valor de ***p*** < 0,001. Para a dieta Caseína, a comparação "CL" e "Ci" , também mostrou ***p*** < 0,001, bastante significante para a Lactoferrina. Esses resultados podem ser vistos nas Figuras 64 e 65 respectivamente, e na Tabela 15.

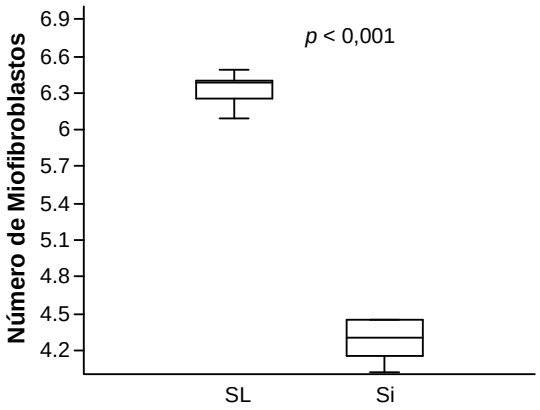

Figura 64 – Comparação do número de Miofibroblastos entre SL e Si.
SL = Grupo Soja com Lactoferrina; Si = Grupo Soja sem Lactoferrina

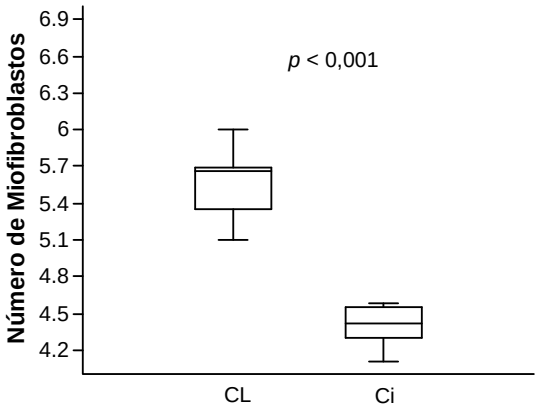

Figura 65 – Comparação do número de Miofibroblastos entre CL e Ci.
CL = Grupo Caseína com Lactoferrina; Ci = Grupo Caseína sem Lactoferrina.

Tabela 15 - Variação média do número de miofibroblastos

Grupos	*MNMf* ± SD	Val. de *p*
SL	6,31 ± 1,57	***< 0,001***
CL	5,52 ± 1,48	
Si	4,26 ± 1,30	*> 0,05*
Ci	4,38 ± 1,54	
SL	6,31 ± 1,57	***< 0,001***
Si	4,26 ± 1,30	
CL	5,52 ± 1,48	***< 0,001***
Ci	4,38 ± 1,54	
Ci	4,38 ± 1,54	***< 0,001***
SL	6,31 ± 1,57	

MNMf = médias do número de miofibroblastos (MF) ± Desvio Padrão, dos grupos de animais.

6.2.3.2 Área dos Miofibroblastos (AMf)

As comparações das áreas dos miofibroblastos foram efetuadas pelo método estatístico ANOVA. As médias por animal são mostradas no Apêndice 17 (ver Apêndices).

Na comparação entre os grupos: “SL e Si”; “CL e Ci” obteve-se valor de $p < 0,001$, diferença bastante significante a favor do grupo Lactoferrina, e “Ci e SL” obteve $p < 0,01$ como se pode observar nas Figuras 66 e 67 e 68 respectivamente, e na Tabela 16.

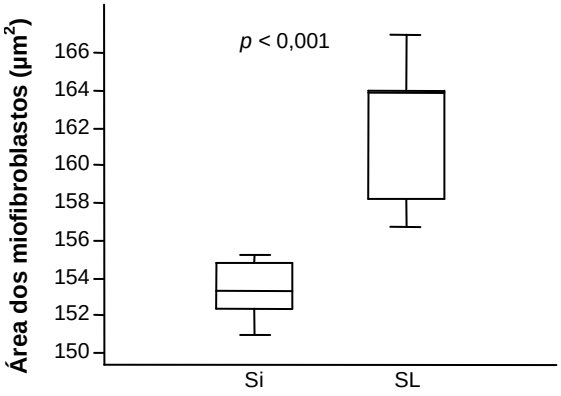

Figura 66 – Comparação da Área (µm^2) entre Si e SL.
Si = Soja sem Lactoferrina; SL = Soja mais Lactoferrina

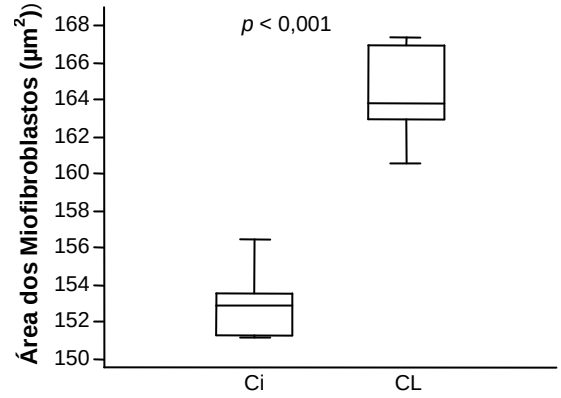

Figura 67 – Comparação da Área (µm^2) entre Ci e CL.
Ci = Caseína sem Lactoferrina; CL = Caseína mais Lactoferrina

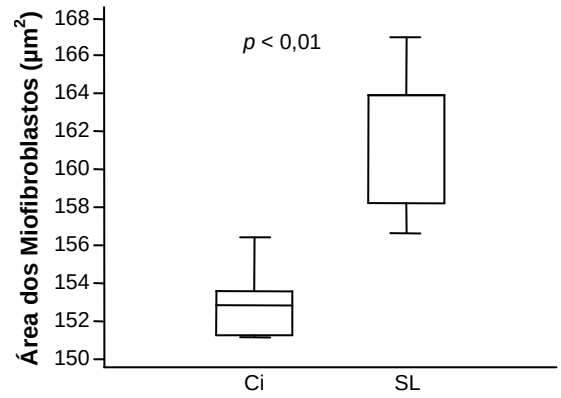

Figura 68 – Comparação da Área (µm^2) entre Ci e SL.
Ci = Caseína sem Lactoferrina; SL = Soja mais Lactoferrina

Entre os grupos “SL e CL” e entre os grupos “Si e Ci” as comparações não mostraram diferenças significantes, como se pode observar nas Figuras 69 e 70 respectivamente, e .na Tabela 16.

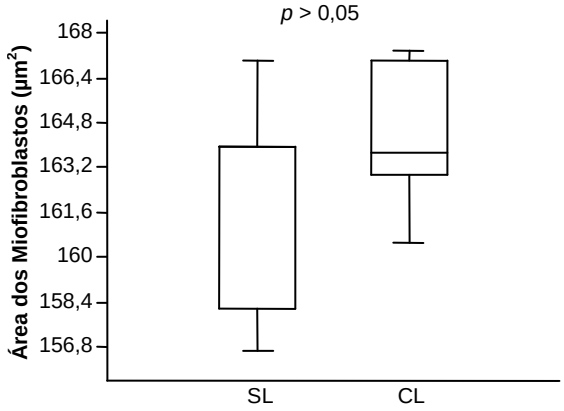

Figura 69 – Comparação da Área (µm^2) entre SL e CL.
SL = Soja mais Lactoferrina ; CL = Caseína mais Lactoferrina

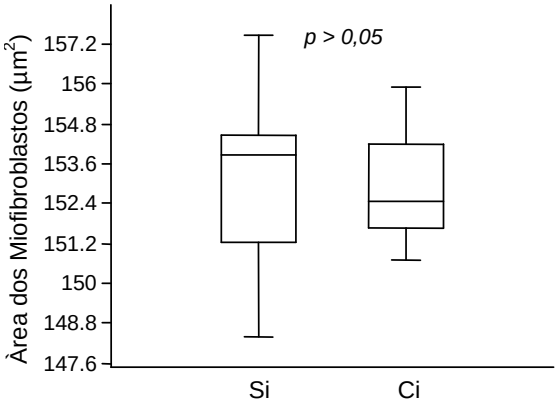

Figura 70 – Comparação da Área (µm^2) entre Si e Ci.
Si = Soja sem Lactoferrina ; Ci = Caseína sem Lactoferrina

Tabela 16 - Variação média das áreas (µm^2) dos miofibroblastos

Grupo	***MNMf* ± SD**	**Val. de *p***
SL	161,99 ± 6,99	*> 0,05*
CL	164,13 ± 6,47	
Si	153,24 ± 5,66	*> 0,05*
Ci	152,85 ± 4,43	
SL	161,99 ± 6,99	***< 0,001***
Si	153,24 ± 5,66	
CL	164,13 ± 6,47	***< 0,001***
Ci	152,85 ± 4,43	
Ci	152,85 ± 4,43	***< 0,01***
SL	161,99 ± 6,99	

MNMf = médias do número de miofibroblastos (MF) ± Desvio Padrão, dos grupos de animais.

6.2.4 Análises de Regressão e Correlação

Houve significante relação do número (NMf) e área dos miofibroblastos (AMf) da pericripta dos grupos de animais que receberam a suplementação de Lactoferrina (CL e SL) quanto ao comprimento (altura) das vilosidades (CV) e profundidade das criptas (PC).

O comprimento das vilosidades (CV) em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,83 e Coeficiente de Correlação (r) 0,91 para o grupo CL (ver Figura 71) e para o grupo SL, mostrou r^2 = 0,73 e r = 0,85 ambos próximos de 1 (um) indicando relação alta (ver Figura 72).

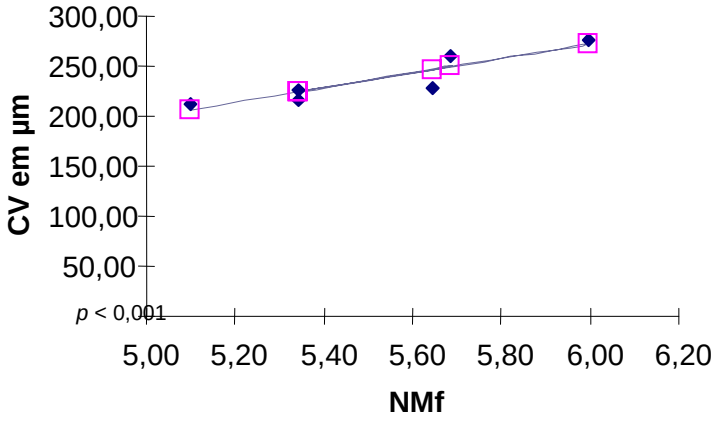

Figura 71 - Comprimento das Vilosidades (CV) vs Número de Miofibroblastos (NMf) para Grupo CL

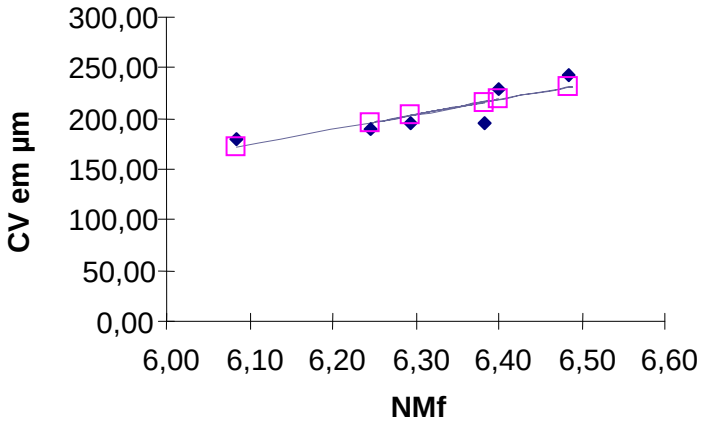

Figura 72 - Comprimento das Vilosidades (CV) vs Número de Miofibroblastos (NMf) para Grupo SL.

O comprimento das vilosidades em relação à área de miofibroblastos (AMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,91 e Coeficiente de Correlação (r) 0,95 para o grupo CL (ver Figura 73) e para o grupo SL: (r^2) = 0,71 e (r) = 0,84, ambos próximo de 1,0 indicando relação alta. (ver Figura 74)

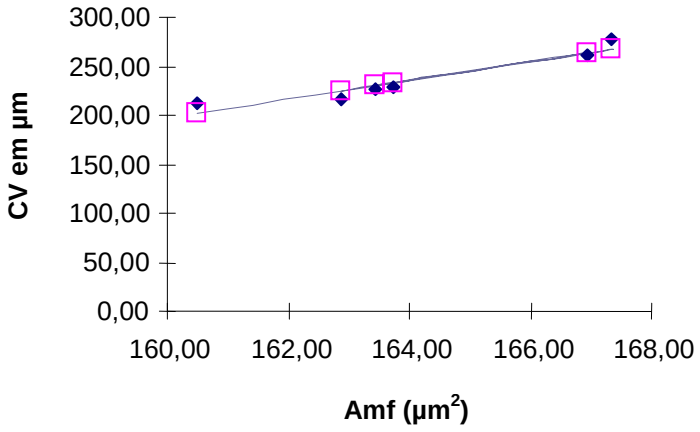

Figura 73 - Comprimento das Vilosidades (CV) vs Área dos Miofibroblastos (AMf) para Grupo CL

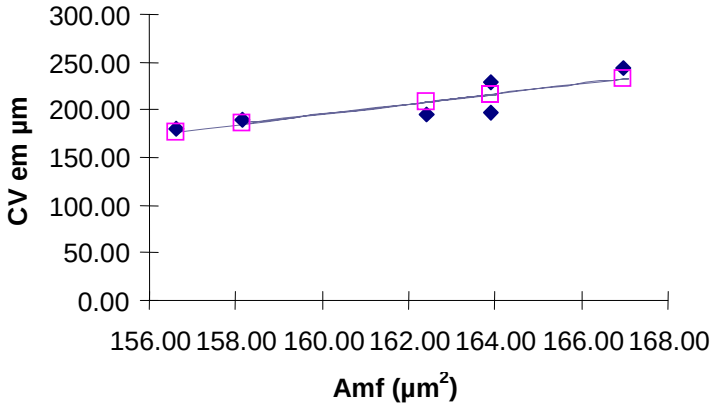

Figura 74 - Comprimento das Vilosidades (CV) vs Área dos Miofibroblastos (AMf) para Grupo SL.

A profundidade das criptas (PC) em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou (r^2)= 0,94 e (r) = -0,97 para o grupo CL (ver Figura 75) e para o grupo SL (r^2) = 0,79 e (r) = -0,89, (ver Figura 76) ambos próximo de 1,0 indicando relação alta com (r) negativo indicando uma relação inversa.

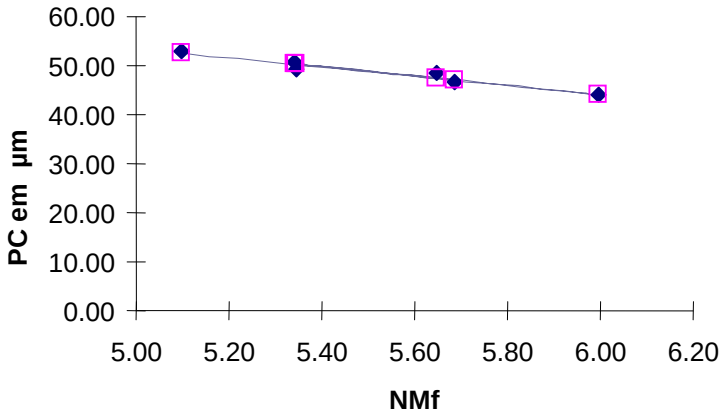

Figura 75 – Profundidade das Criptas (PC) vs Número de Miofibroblastos (NMf) para Grupo CL.

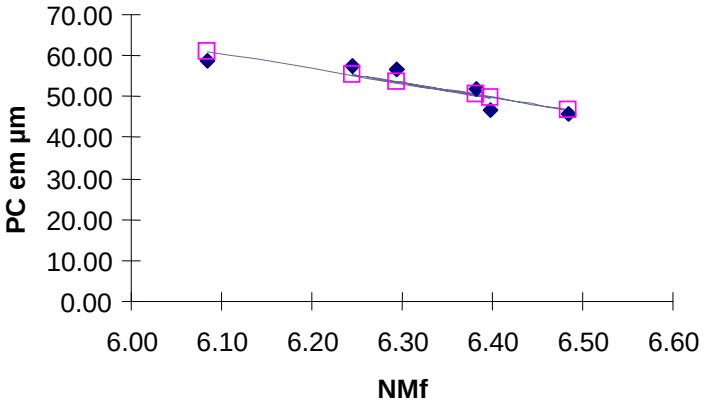

Figura 76 – Profundidade das Criptas (PC) vs Número de Miofibroblastos (NMf) para Grupo SL.

A profundidade das criptas (PC) em relação à área de miofibroblastos (AMf) mostrou (r^2)= 0,94 e (r) = -0,97 para o grupo CL (ver Figura 77) e para o grupo SL (r^2) = 0,70 e (r) = -0,87 (ver Figura 78), ambos próximo de 1,0 indicando relação alta com (r) negativo indicando uma relação inversa.

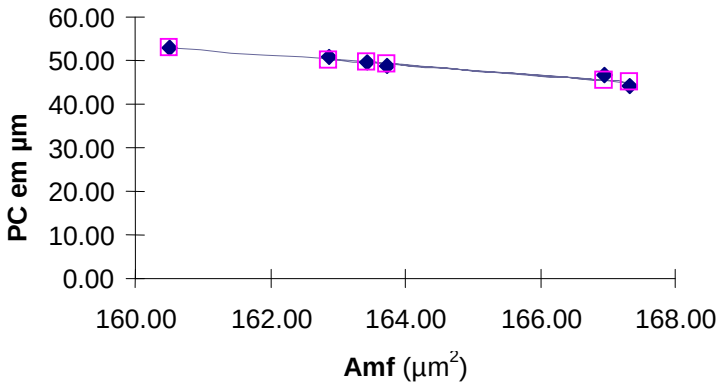

Figura 77 - Profundidade das Criptas (PC) vs Área dos Miofibroblastos (AMf) para Grupo CL.

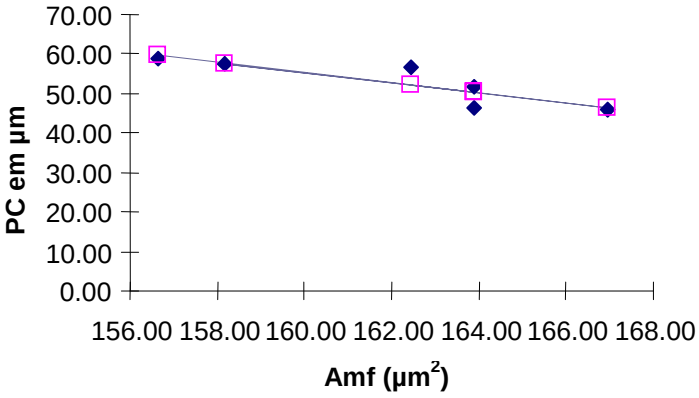

Figura 78 - Profundidade das Criptas (PC) vs Área dos Miofibroblastos (AMf) para Grupo SL.

6.3 - Resultados do Experimento II – Parte 2:

Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de enteroanastomoses, em intestino delgado de ratos.

6.3.1 Análise Histomorfológica e Histomorfométrica da Cicatrização das Enteranastomoses

Nessa segunda parte do Experimento II, a avaliação do processo de cicatrização da enteroanastomose, foram utilizados apenas os grupos CL (Caseína mais Lactoferrina) e

Ci (Caseína isoladamente) e contemplou os seguintes parâmetros: neovascularização; presença de células polimorfo e mononucleares; deposição de colágeno tipo I e tipo III; número e área de miofibroblastos. A Figura 92 mostra um segmento de intestino seccionado, contendo a região de cicatrização da anastomose.

6.3.1.1 Avaliação do número de células polimorfonucleares (CPn)

As médias do número de polimorfonucleares, por animal são mostradas no Apêndice 18 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença bastante significante para o grupo Ci apresentando probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na (Tabela 17 e Figura 79).

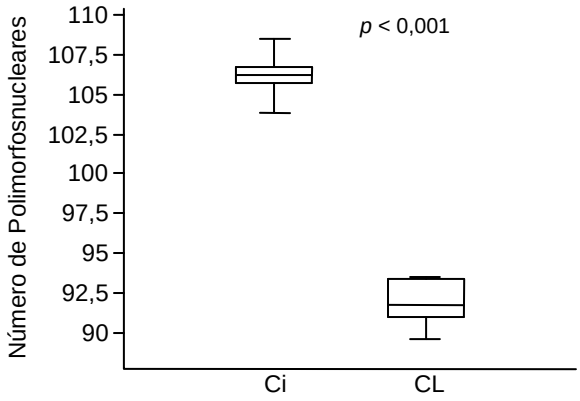

Figura 79 – Comparação dos números de Polimorfonucleares.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.2 Avaliação do número de células mononucleares (CMn)

As médias do número de mononucleares, por animal são mostradas no Apêndice 19 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença bastante significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 17 e Figura 80.

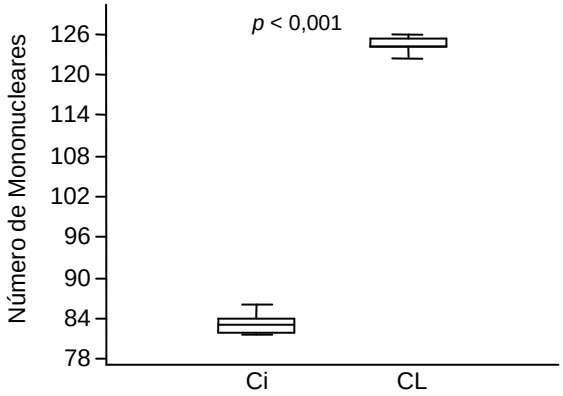

Figura 80 – Comparação dos números de Mononucleares
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

Tabela 17 - Variação média entre os grupos, quanto ao número de células polimorfonucleares e mononucleares.

Elementos	Grupo	*MNE* ± SD	Val. de *p*
Polimorfonucleares	Ci	106,16 ± 1.58	***< 0,001***
	CL	91,72 ± 1.61	
Mononucleares	Ci	83,06 ± 1,69	***< 0,001***
	CL	124,15 ± 1,39	

MNE = Médias do número de elementos ± Desvio Padrão, dos grupos de animais

6.3.1.3 Avaliação do número de Miofibroblastos (Mf)

As médias do número de Miofibroblastos por animal, são mostradas no Apêndice 20 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença altamente significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 16 e Figura 81.

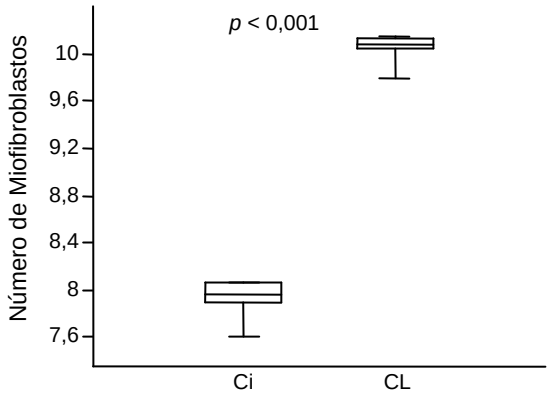

Figura 81 – Comparação dos números de Miofibroblastos.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.4 Avaliação da Área (µm2) dos Miofibroblastos (Mf)

As médias da área dos Miofibroblastos por animal, são mostradas no Apêndice 21 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença altamente significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 18 e Figura 82.

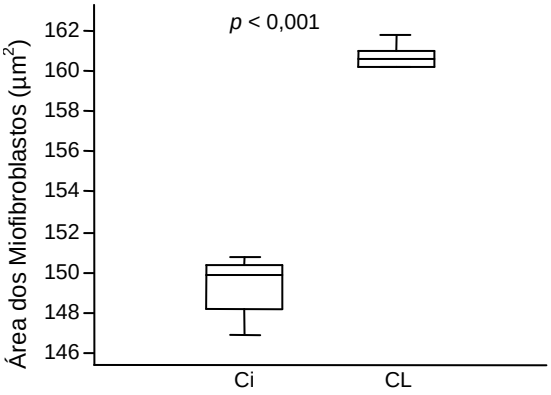

Figura 82 – Comparação das áreas (μm^2) dos Miofibroblastos.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.5 Avaliação do número de vasos sanguíneos

As médias do número de vasos sanguíneos por animal, são mostradas no Apêndice 22 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença bastante significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 18 e Figura 83.

.

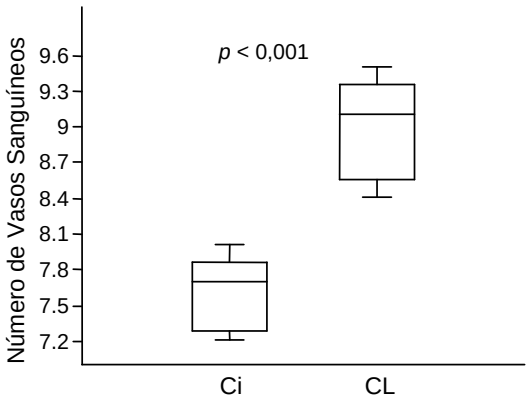

Figura 83 – Comparação do número de vasos sanguíneos.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

Tabela 18 - Variação média entre os grupos, quanto ao número e área dos miofibroblastos (µm^2) e do número de vasos sanguíneos.

Elementos	Grupo	*MNE* ± SD	Val. de *p*
Número de Miofibroblastos	Ci	7,90 ± 0,92	***< 0,001***
	CL	10,04 ± 0,86	
Área dos Miofibroblastos	Ci	149.19 ± 6.89	***< 0,001***
	CL	160.69 ± 6.09	
Número de Vasos Sanguíneos	Ci	7,59 ± 0,99	***< 0,001***
	CL	9.00 ± 1.04	

MNE = Médias do número de elementos ± Desvio Padrão, dos grupos de animais.

6.3.1.6 Avaliação da percentagem (%) do Colágeno tipo I.

As médias da percentagem de Colágeno tipo I por animal, são mostradas no Apêndice 23 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença bastante significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 19 e Figura 84.

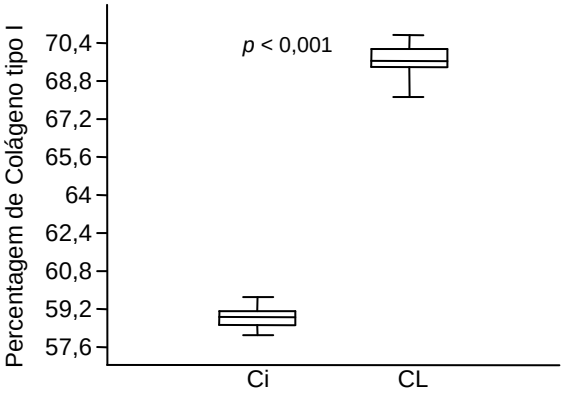

Figura 84 – Comparação da percentagem (%) de Colágeno tipo I entre Ci e CL.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.7 Avaliação da percentagem (%) do Colágeno tipo III.

As médias da percentagem de Colágeno tipo III por animal, são mostradas no Apêndice 24 (ver Apêndices). A comparação entre os grupos “Ci e CL” mostrou diferença bastante significante para o grupo CL, com probabilidade ***p*** <.0,001 como se pode observar na Tabela 19 e Figura 85.

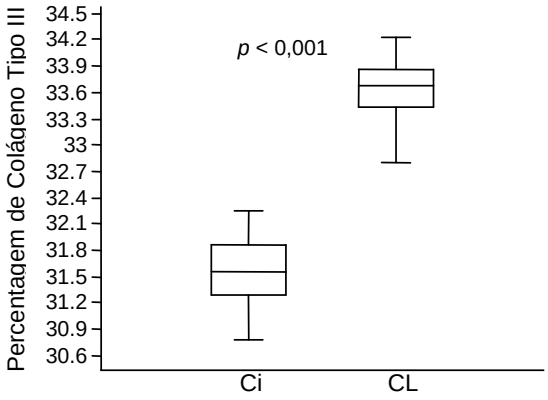

Figura 85 – Comparação da percentagem (%) de Colágeno tipo III entre Ci e CL.
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.8 Índice de Maturação do Colágeno (IMaC).

O índice da maturação do colágeno (IMaC) na cicatrização da anastomose, foi menor para o grupo Ci em relação ao grupo CL com diferença altamente significante, mostrando ***p*** < 0,001, como se pode visualizar na Figura 86 e na Tabela 19.

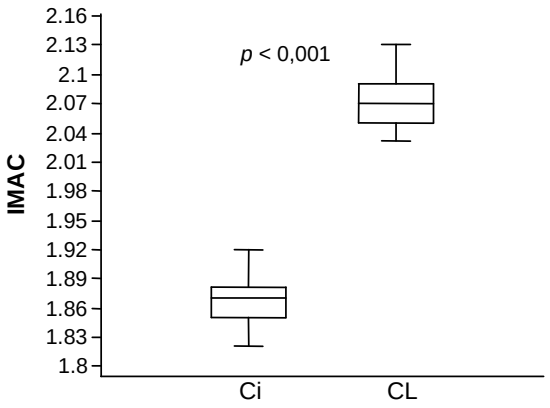

Figura 86 – índice de Maturação do Colágeno (IMaC).
Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina ; CL = grupo Caseína mais Lactoferrina

6.3.1.9 **Colagenização** (%).

A deposição total de colágeno foi obtida pela soma dos valores encontrados para o Colágeno Tipo I e Tipo III, refletindo a percentagem da área dos campos ocupada por colágeno. As médias obtidas por animal dos grupos Ci e CL são mostradas no Apêndice 25 (ver Apêndices). Houve diferença bastante significante a favor do grupo com Lactoferrina (CL) com valor de ***p*** < 0,001.como se pode ver na Figura 87 e na Tabela 19.

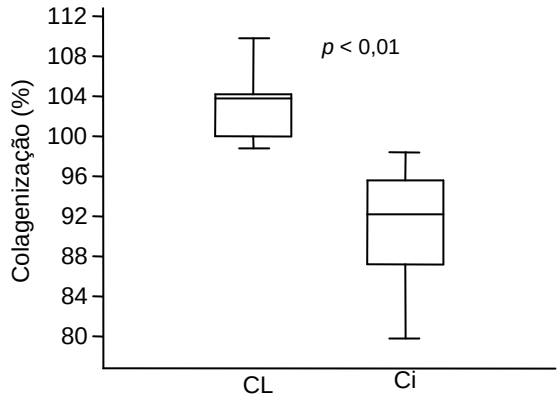

Figura 87 – Comparação da Colagenização (%) entre Ci e CL.
CL = grupo Caseína mais Lactoferrina ; Ci = grupo Caseína sem Lactoferrina

Tabela 19 - Variação entre os grupos, quanto à percentagem (%) de deposição dos colágenos tipo I , tipo III e índice de maturação do colágeno (IMaC).

Elementos	Grupo	*MdE* ± SD	Val. de *p*
Colágeno Tipo I (%)	Ci	58.82 ± 3.56	***< 0,001***
	CL	69.63 ± 2.70	
Colágeno Tipo III (%)	Ci	31.52 ± 3.77	***< 0,001***
	CL	33.62 ± 2.79	
IMaC	Ci	1.87 ± 0,03	***< 0,001***
	CL	2,07 ± 0,02	
Colagenização (%)	Ci	90,34 ± 16,21	***< 0,001***
	CL	103,25 ± 15,63	

MdE±SD = Média dos elementos por grupo ± Desvio Padrão

6.3.2 Análises de Regressão e Correlação

As análises que mostraram significante relação, foram as do número de miofibroblastos do Grupo CL (Caseína mais Lactoferrina), quanto à número de Vasos Sanguíneos, deposição do Colágeno Tipo I, Colágeno Tipo III e Colagenização.

6.3.2.1 Número de Vasos Sanguíneos vs Número de Miofibroblastos

O número de vasos sanguíneos (Neovascularização) em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,89 e Coeficiente de Correlação (r) 0,94 para o grupo CL , que se pode observar na Figura 88.

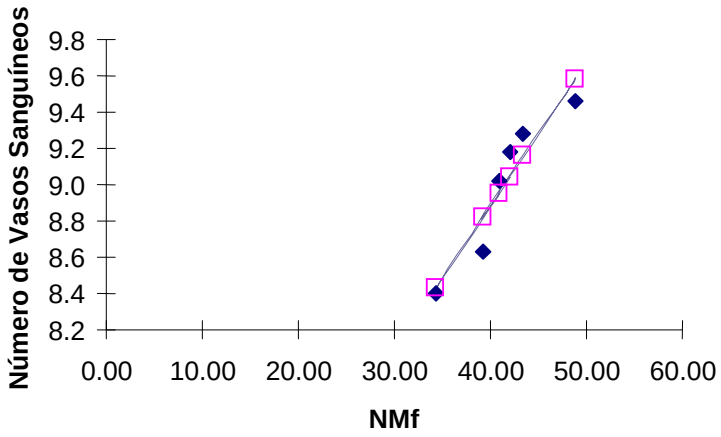

Figura 88 – Número de Vasos Sanguíneos vs Número de Miofibroblastos (NMf) em CL (grupo Caseína mais Lactoferrina).

6.3.2.2 Deposição de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos

A percentagem de deposição do Colágeno Tipo I em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,83 e Coeficiente de Correlação (r) 0,91 para o grupo CL, como se pode observar na Figura 89.

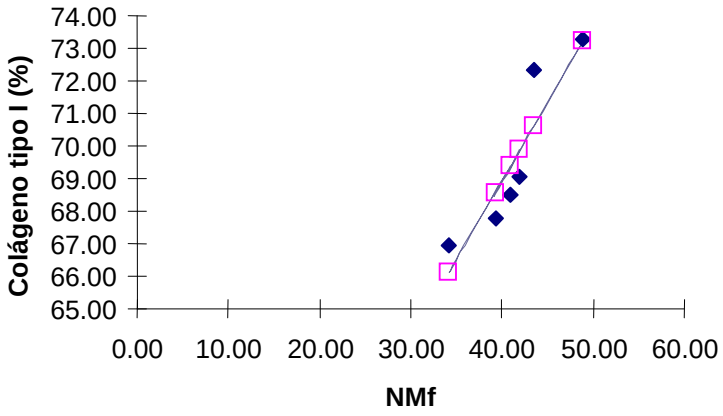

Figura 89 – Percentagem (%) de Colágeno tipo I vs Número de Miofibroblastos (NMf) em CL (grupo Caseína mais Lactoferrina).

6.3.2.3 Deposição de Colágeno tipo III vs Número de Miofibroblastos

A deposição do Colágeno Tipo III em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,74 e Coeficiente de Correlação (r) 0,86 para o grupo CL, como se pode observar na Figura 90.

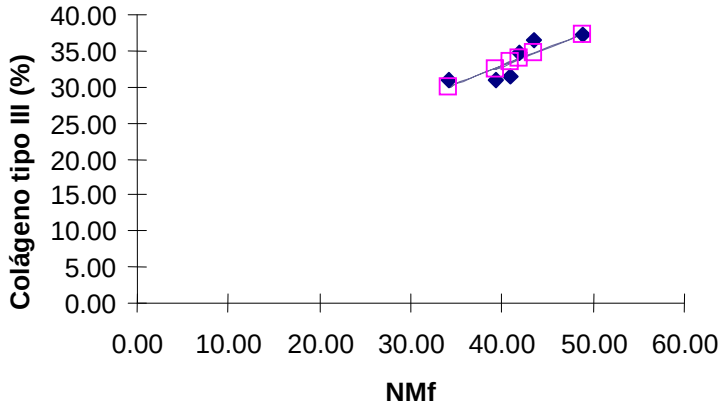

Figura 90 – Percentagem (%) de Colágeno tipo III vs Número de Miofibroblastos (NMf) em CL (grupo Caseína mais Lactoferrina).

6.3.2.4 Colagenização vs Número de Miofibroblastos

A deposição total de Colágeno (Colagenização) em relação ao número de miofibroblastos (NMf) mostrou Coeficiente de Determinação (r^2) de 0,94 e Coeficiente de Correlação (r) 0,97 para o grupo CL, como se pode observar na Figura 91.

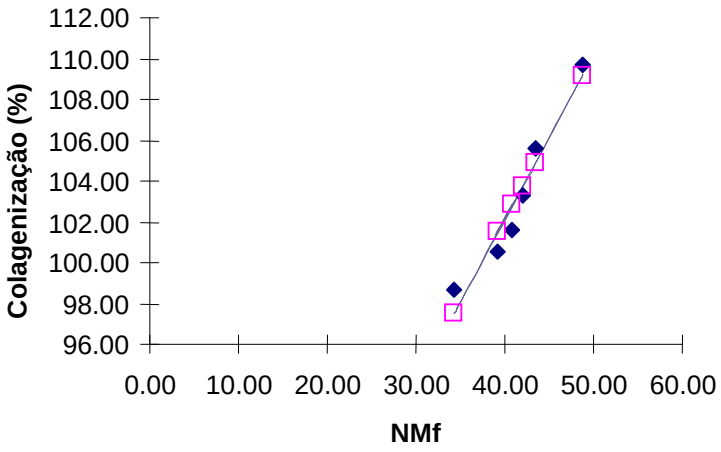

Figura 91 – Percentagem (%) Colagenização vs Número de Miofibroblastos (NMf).

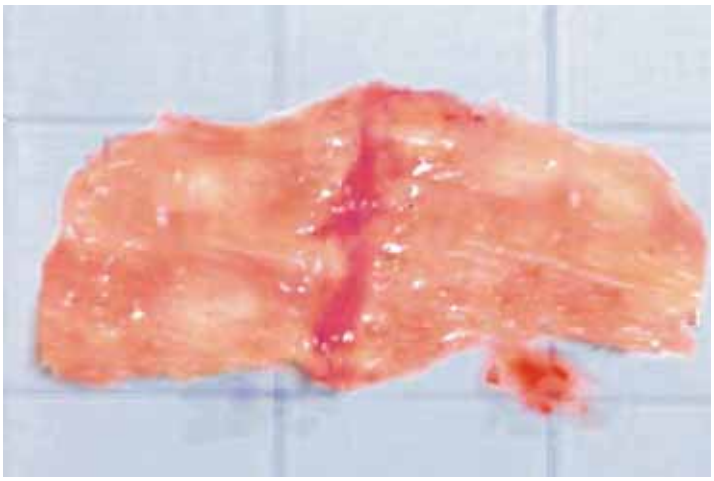

Figura 92 - Segmento de intestino seccionado, contendo a região de cicatrização da anastomose.

7 DISCUSSÃO

7.1 - Discussão do Experimento I: Estudo da Lactoferrina no processo de cicatrização de feridas cutâneas em coelhos.

Diversas são as referências que conferem propriedades estimuladoras de crescimento celular à Lactoferrina, em diferentes tecidos e situações (Hagiwara et al, 1995; Yanaihara 2000; Norrby , 2004; Naot et al, 2005; Schottstedt et al, 2005; Lönnerdal, 2009).

Esse nosso primeiro experimento serviu para nos orientar claramente qual ou quais são as células, direta ou indiretamente estimuladas pela presença dessa proteína, em uma situação fisiológica "*in vivo*". A opção pelo processo cicatricial de uma ferida profunda foi baseada justamente, na diversidade de células, mecanismos e situações, participantes desse complexo processo de regeneração tecidual.

A escolha de coelhos como animal desse experimento teve vários fatores: fácil aquisição; bastante resistentes; tamanho corporal compatível ao das feridas induzidas, o que minimiza o estresse pós-trauma cirúrgico; e finalmente, facilidade no manejo.

O décimo dia do processo de cicatrização foi utilizado para a obtenção do material de estudo, por ser posterior ao sétimo dia, quando se iniciam os mais relevantes mecanismos de regeneração (SIMÕES et al, 1986; MARCHINI et al, 1988) e o 14º dia, quando se observa a quase total resolução do ferimento (MANDELBAUM et al, 2003; BALBINO, 2005).

7.1.1 Sobre a avaliação histológica por H.E. e T.M.

A solução de continuidade é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exudato inflamatório. A intensificação da permeabilidade dos capilares induz ao início da primeira fase do processo: a fase inflamatória. Há a formação do exudato inflamatório, devido à saída de leucócitos, tanto os mononucleares como os polimorfonucleares, do plasma sanguíneo e ainda de hemácias, para toda região da ferida (SIMÕES et al, 1986; RAYNER, et al, 2000). Isso foi observado em ambos os grupos (Controle e *Lactoferrina*), macroscópica e microscopicamente por "esfregaço" corado por Giemsa, apenas para avaliação clínica. São os macrófagos presentes, os responsáveis pela proliferação de novos

vasos sanguíneos no local (angiogênese), devido às suas interações com prostaglandinas e tromboxanos. Dos vasos rompidos, originam-se brotos endoteliais de rápida proliferação, constituindo sólidos cordões, entremeados a fibroblastos, formando pequenos canais que permitem o fluxo sanguíneo. Esse novo conjuntivo, vastamente vascularizado, constitui o chamado, “tecido de granulação” (BATES e JONES, 2003; BALBINO et al, 2005). A proliferação vascular nesta fase foi compatível com o encontrado no nosso experimento. Foi demonstrado por NORRBY (2004) que a lactoferrina aumenta significativamente a angiogênese. A comparação entre os nossos grupos Controle e Lactoferrina, também mostrou diferença a favor da Lactoferrina, mostrando vasos mais desenvolvidos em maior número, indicando um processo mais adiantado, já em remodelação devido à diminuição da área lesada e a conseqüente diminuição da demanda metabólica. Também nessa fase, já se inicia a liberação de inibidores da angiogênese no local (SINGER e CLARK, 1999; BATES e JONES, 2003). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF), segundo BUSSOLINO et al (1992) é um potente fator angiogênico, estimulando o crescimento e a mobilidade das células endoteliais, lembrando que os miofibroblastos, como citado por POWELL et al (1999), são produtores desse fator de crescimento.

Nesse nosso experimento, a comparação entre os números de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, apresentou diferença estatisticamente significante, a favor dos mononucleares, semelhante ao que encontraram CHEN et al (2011) avaliando o efeito do extrato de cactus nas queimaduras de segundo grau, em camundongos. Estes achados estão de acordo com a literatura, de que os neutrófilos são os primeiros leucócitos a se dirigirem para a área da lesão e ali sobrevivem pouco tempo (ROSS et al, 1993), e mesmo alguns inativos podem ser fagocitados pelos macrófagos (SINGER e CLARK, 1999; MANDELBAUM et al, 2003; BAUM e ARPEY, 2005; LI et al, 2007).

Em seguida inicia-se a fase proliferativa ou de fibroplasia. Em torno de quatro dias, os fibroblastos predominam no tecido de granulação em desenvolvimento. O equilíbrio perfeito do colágeno durante o processo cicatricial é dado por essas células, as quais são responsáveis tanto pela sua produção como sua reabsorção (MADDEN e PEACOCK,1971). O colágeno produzido pelos fibroblastos no tecido de granulação é composto por

mucopolissacarídeos envolvidos na produção e orientação das fibras colágenas (BALBINO, 2005; LI et al, 2007). A densidade populacional dos fibroblastos alcança o máximo próximo do décimo dia após a lesão (SINGER e CLARK, 1999; ; BAUM e ARPEY, 2005).

Os valores obtidos na contagem de fibroblastos mostraram-se significativamente altos no nosso grupo Lactoferrina, coincidentemente ao achado de BONOMO (2000) estudando os efeitos de oxigênio em câmera hiperbárica, nas feridas de coelhos e com os dados de SORG (2009) que estudou os efeitos da eritropoietina na cicatrização da pele de camundongos. Um estudo, ““*in vitro*””, efetuado por CHEN et al (2006) demonstrou a propriedade da Lactoferrina, estimular o crescimento no número de queratinócitos, em cultura de células humanas. O mesmo mostrou TANG et al (2010), também “*in vitro*”, utilizando-se de Lactoferrina humana. A reepitelização, no nosso experimento, mostrou-se igualmente, mais acentuada para o grupo Lactoferrina. Esse resultado é similar aos encontrados por SUGUNA et al (1996) estudando os efeitos da Centella asiática na cicatrização da pele em ratos.

7.1.2 Sobre a deposição de Colágeno Tipo I e Tipo III e Índice de Maturação (IMaC):

A deposição e organização do colágeno na área lesada estão diretamente ligadas ao número de fibroblastos na região e são determinantes para um bom processo cicatricial (SINGER e CLARK, 1999). A proliferação dos fibroblastos e a conseqüente intensidade na produção de colágeno iniciam-se logo nas primeiras horas da lesão. Ao redor do quarto dia, há a produção de fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia, tanto como, a neovascularização (ORGILL e DEMLING, 1988).

Os cortes histológicos corados pelo picrosírius permitem detectar o tipo de colágeno, bem como obter a sua quantificação. Para o estudo do colágeno tecidual o corante picrosírius é específico, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). Além disso, é seletivo, pois ao microscópio de luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I sendo mais espessas e birrefringentes se apresentam com coloração em tons de amarelo a vermelho. Já as fibras

mais delgadas pouco birrefringentes e mais dispersas do colágeno tipo III, apresentam-se esverdeadas. (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). Dessa maneira, *softwares* para a determinação da área ocupada por determinada cor e, mesmo diferenças de intensidade desta, permitem quantificar o colágeno que lhe é específico, através de um computador.

A derme intacta é composta por 85% de colágeno do tipo I e 15% do colágeno do tipo III. No tecido de granulação, há aumento progressivo do colágeno do tipo III, em até 30% na fase inflamatória, o qual, em conjunto com a fibronectina, constitui a matriz inicial. A partir do quarto dia após a lesão, há decréscimo rápido do colágeno tipo III, sem exercer influência importante na resistência da ferida (EHRLICH e KRUMMEL, 1996). O colágeno do tipo I está presente na ferida em 24 horas no pós-operatório e aumenta progressivamente, até a sua maturação. Sua síntese se mantém por período mínimo de quatro semanas após o ferimento. (WITTE e BARBUL 1997).

No presente estudo houve maior deposição do colágeno tipo I (maduro) na cicatriz dos animais do grupo Lactoferrina (FL), O colágeno tipo III (imaturo), no experimento, apresentou deposição muito semelhante nos dois grupos. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por HAUKIPURO et al (1991) estudando a síntese do colágeno tipo I, na cicatrização de feridas, em humanos. O índice da maturação do colágeno (IMaC) , obtido pela razão da quantidade do colágeno maduro (tipo I) pelo colágeno imaturo (tipo III) (COELHO-LEMOS, et al,2004) no presente experimento, foi maior para o grupo Lactoferrina (FL), na comparação entre as médias, provavelmente pela diminuição do colágeno tipo III neste grupo. Resultado semelhante foi encontrado por PANDARINATHAN et al (1998) na avaliação da influência da *Aloe vera* nas características do colágeno na cicatrização da pele, em ratos.

7.1.3 Sobre o número e área dos Miofibroblastos

Os miofibroblastos são células altamente diferenciadas e que apresentam organelas especializadas. São importantes produtoras de colágeno dos tipos I e III (FRITSCH et al, 2002). O aumento no número e tamanho dos miofibroblastos, podem

implicar em maior síntese e deposição do colágeno tipo I na área lesada. (SCHURCH, SEEMAYER e GABBIANI, 1998; HINZ et al. 2001; LORENA et al. 2002).

Algumas proteínas podem estimular a proliferação de miofibroblastos, como por exemplo, foi mostrado por DROBNIK et al (2009) a respeito do TSH, glicoproteína produzida pela Hipófise e que funciona como hormônio regulador das funções da Tireóide. O aumento do número de miofibroblastos e a conseqüente intensificação na deposição de colágeno, também foi demonstrado por CANTINI et al (2008) no seu estudo sobre o papel da Miostatina da Doença de Peyronie. Outra proteína que pode ser encontrada em vários órgãos, agindo como mensageiro químico capaz de induzir a proliferação de miofibroblastos é a Endotelina (ET) produzida pelo endotélio, como mostra o estudo feito por NISHIDA et al (2006). Um experimento conduzido por NAKAMURA et al (2003) mostrou que outro hormônio peptídico, a Leptina, produzida por adipócitos e com estrutura semelhante às citocínas, promove aumento no número e tamanho dos miofibroblastos.

O nosso experimento, mostrou semelhantemente, que o uso da Lactoferrina durante os 10 dias pós-lesão, influenciou de forma significativa, a proliferação e o tamanho dos miofibroblastos. Como visto anteriormente, os miofibroblastos produzem e secretam: citocinas (citoquinas), mediadores de inflamação e fatores de crescimento dos quais destacamos o HGF e KGF, entre os tantos enumerados por POWELL (1999) que apresentam interesse especial nesse nosso experimento, por serem fatores estimulantes da proliferação de células epiteliais e, portanto, terem importante participação na reepitelização, a qual foi bastante significante com o uso da Lactoferrina.

Também são miofibroblastos os responsáveis pela diminuição da área lesada. Sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento de feridas após a lesão, processo conhecido como contração da ferida (GABBIANI, 2003). Segundo DARBY et al (1990) a α-SMA expressada pelos miofibroblastos é quase nula nos quatro dias após a lesão, mas acumula-se gradualmente, começando a agir intensamente entre o quinto e sexto dias até o décimo quinto dia, quando então sua ação passa a decrescer. KWON et al (2006) em seu experimento com aplicação tópica de Fator de Crescimento Epidermal (EGF) em feridas de ratos, mostrou que os miofibroblastos geram forças contráteis para puxar ambas as bordas

da ferida aberta, após o quinto dia do processo de cicatrização. Esses resultados são condizentes com os encontrados no nosso presente experimento.

7.2 Discussão do Experimento II – Parte 1: Estudo da Lactoferrina na atrofia induzida em intestino delgado de ratos.

O maior contingente de estudos do papel da Lactoferrina na mucosa intestinal têm sido os relacionados à participação dessa proteína no controle de microrganismos, principalmente relacionados à sua capacidade no transporte de ferro e outros metais (SANCHEZ et al, 1992; VORLAND, 1999; STEVANATO, 2005).

Esse nosso segundo experimento, alicerçado nos achados do experimento I, avaliou a atuação da Lactoferrina, com maior ênfase, na proliferação celular, tanto no que diz respeito à regeneração das vilosidades intestinais submetidas à atrofia, como também na cicatrização de toda a parede do órgão, após ressecção cirúrgica seguida de anastomose. A escolha dos ratos Wistar, como animal experimental foi baseando-se em estudo anterior, o qual permitiu comparação e estudo estatístico entre grupos (CARUSO e DEMONTE, 2005). As vantagens na escolha desses animais são: permite ótima padronização, fácil obtenção, baixo custo, pequeno espaço físico para alojamento e facilidade no manejo,

HAGIWARA et al (1995) com experimento em cultura de células intestinais de ratos, mostraram eficiente atividade da Lactoferrina bovina associada a EGF (Epidermal Growth Factor), na proliferação dos enterócitos.

7.2.1 Sobre o peso dos animais

No primeiro dia do experimento houve uma prévia seleção dos animais para que se fizesse homogeneização dos pesos corporais. No quinto dia a diferença significante entre os grupos Caseína sem Lactoferrina (Ci) e Soja sem Lactoferrina (Si) é explicada pela atrofia das vilosidades provocada pela alergenicidade das proteínas e/ou fatores antinutricionais da soja, logo nas primeiras 24 horas após a ingesta (KILSHAW e SLADE, 1982) e conseqüente má absorção dos nutrientes. O mesmo é valido para a comparação entre os grupos “CL” e “SL” apesar da diferença entre as médias ser menos significante, o que pode ser explicado pelo estudo de CONNEELY (2001) no qual descreve atividades

antialergênicas da Lactoferrina se manifestando em poucas horas. Também, a Lactoferrina pode ter demonstrado alguma atividade no repovoamento das vilosidades.

A diferença entre os grupos “SL e Si” com $p < 0,05$ a favor da Lactoferrina, indica que nesse período essa proteína está realmente, de certo modo, exercendo alguma situação favorável, em termos nutricionais quando há atrofia das vilosidades provocada por proteínas da soja. A comparação entre os grupos “CL” e “Ci” não apresentou diferença, apesar da média de peso ser aproximadamente 1,2% maior para o grupo CL. Isso talvez, se justifique pelo fato de haver mecanismos que mantêm a homeostase da mucosa intestinal, evitando hipoplasia ou o oposto, hiperplasia das vilosidades, situações que podem alterar o grau de absorção intestinal (MAY et al, 1981).

Os intrínsecos mecanismos que regulam a proliferação de células no intestino delgado não estão bem definidos. Estudos na replicação das células epiteliais intestinais, ““*in vivo*””, têm sugerido que é o tamanho da vilosidade que regula a proliferação das células na cripta, através de controle negativo de feedback. MAY et al. (1981) em um experimento “*in vitro*” com a linhagem EIC-6 de células do intestino delgado de ratos, purificaram parcialmente, um fator que inibe a síntese de DNA e o crescimento dessas células, não era citotóxico e parecia ter especificidade para o epitélio intestinal. Entretanto, em um experimento utilizando-se culturas de diferentes linhagens de células intestinais, GÖKE, KANAI e PODOLSKY (1998), demonstraram que fibroblastos diferenciados (miofibroblastos) frequentemente presentes nesses modelos de culturas, regulavam a proliferação das células, por ação parácrina. Mais recentemente NEUNLIST et al (2007), também em um experimento “*in vitro*”, mostraram que componentes neuronais e gliais do Sistema Nervoso Entérico, em especial as Células Gliais, poderiam agir em conjunto com outros componentes da mucosa, tais como miofibroblastos, para fazer um controle mais aprimorado na proliferação celular do epitélio intestinal e contribuir para a manutenção da homeostase.

7.2.2 Sobre a Histomorfometria da mucosa intestinal

A histomorfometria da mucosa intestinal é rotineiramente utilizada em experimentos dessa natureza, pois as dimensões das vilosidades e das criptas retratam claramente as condições fisiológicas ou as patológicas, às quais o aparelho digestório está

sendo submetido, em um determinado momento. Como citado anteriormente, inúmeras são as situações que podem provocar alterações na mucosa (RHAME, 1990; THOMSON et al, 1996; WELLS et al, 1997; CARUSO e DEMONTE, 2005). Diferentes substâncias, em diferentes experimentos, têm se mostrado estimuladoras do aumento da altura das vilosidades e diminuição da profundidade das criptas. KING et al (2008) mostraram esses efeitos utilizando colostro bovino na dieta de leitões precocemente desmamados. Esse resultado era esperado, uma vez que o colostro é rico em fatores de crescimento celular, tanto que o soro de leite bovino é componente freqüente dos meios de culturas celulares. No entanto, LEE et al (2008) mostraram que a suplementação combinada de fator de crescimento epidérmico (EGF) suíno e glutamina não apresenta efeito no desenvolvimento intestinal de leitões desmamados precocemente.

READ-SNYDER et al (2009) exibiram, também, resultado nesse sentido ao utilizar Selênio na dieta de frangos infectados por reovirus. Outro estudo elaborado por GARCIA et al (2007), desta vez utilizando-se de acido fórmico associado a extrato de plantas mostrou resultado similar. ASFAR (2003) mostrou que atrofia das vilosidades da mucosa de ratos, induzida pelo jejum, foi revertida ao normal com a ingestão de chá verde e também, em menor proporção, pela vitamina E. Já o chá preto não mostrou esse efeito.

No presente experimento, a comparação entre os grupos de animais que receberam dietas tendo Caseína ou Soja como única fonte protéica, suplementadas ou não com Lactoferrina, mostra exatamente o comportamento e a resposta que o intestino delgado é capaz de apresentar quando submetido a diferentes condições nutricionais.

Como já era esperado, baseando-se em estudo anterior (CARUSO e DEMONTE, 2005), a comparação da altura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais, apresentaram diferenças altamente significantes para os grupos Caseína sem suplementação de Lactoferrina (Ci) e Soja sem a suplementação (Si) com $p < 0,001$, refletindo que realmente, como citado na literatura, a soja em um primeiro momento, provoca atrofia das vilosidades (KILSHAW e SLADE, 1982). O oposto se dá em relação à profundidade das criptas, que se mostram hiperplásicas em direção à submucosa, no intuito de repovoar, por mitoses consecutivas, as suas respectivas vilosidades. Nosso experimento

mostrou diferença altamente significante para o grupo Si comparado ao Ci com $p < 0,001$. Esses dois resultados mostram que ainda após 15 dias, a mucosa não estava recuperada, mostrando um déficit nutricional que se refletiu no peso dos animais desse grupo Si em relação ao grupo Ci, também com $p < 0,001$, como citado anteriormente. O comprimento (altura) das vilosidades para os grupos CL (Caseína com suplementação de Lactoferrina) e SL (Soja com suplementação de Lactoferrina) mostrou diferença bastante significante a favor grupo CL com valor de $p < 0,001$, porém a média da altura das vilosidades do grupo SL foram bem maiores que do grupo Si (Soja sem Lactoferrina) com $p < 0,001$, mostrando que essa suplementação apresentou alguma atividade estimuladora na proliferação do enterócitos, que se refletiu favoravelmente no peso dos animais suplementados com Lactoferrina ($p < 0,001$). Esse resultado mostra, também, que a atividade da Lactoferrina "*in vivo*" pode ser semelhante à mostrada por OGUCHI et al (1995) "*in vitro*". Resultados semelhantes foram mostrados por WANG et al (2006) no seu trabalho com suínos suplementados com 1g/kg de Lactoferrina.

Apesar de o grupo CL apresentar a média do comprimento das vilosidades, apenas ligeiramente maior que a do grupo Ci, sem diferença estatisticamente significante, este resultado mostra maior conformidade com os achados da literatura, os quais demonstram claramente que existem mecanismos altamente eficazes para a manutenção da homeostase do epitélio intestinal (MAY et al, 1981; GÖKE, KANAI e PODOLSKY, 1998; NEUNLIST et al, 2007). O mesmo é válido, consequentemente, para a comparação da profundidade das criptas entre esses dois grupos e também, ainda em relação aos grupos CL e SL, que não mostrou diferença na profundidade das criptas, mesmo que a altura das vilosidades tenha sido significantemente maior para o grupo Caseína. Isso nos leva a crer que a determinado comprimento da vilosidade, já exista uma parcial ação inibidora da mitose nas criptas, pelos mecanismos de controle citados acima.

7.2.3 Sobre o número e área dos miofibroblastos da pericripta intestinal.

Como visto no nosso Experimento I, os miofibroblastos exercem atividade fundamental no processo de cicatrização da pele e inúmeros são os estudos que procuram demonstrar o papel dessas células no trato gastrointestinal. Alguns mostram aspectos

benéficos (ØRSKOV et al, 2005; POWELL et al, 2005; NISHIDA et al, 2006; SAADA et al, 2006; SHAO e SHENG, 2010) e outros citam atividades prejudiciais (JOBSON, BILLINGTON e HALL, 1998; ILLEMANN et al, 2004; SHAO et al, 2006).

Os miofibroblastos subepiteliais, mais próximos à periferia das criptas intestinais, denominados de miofibroblastos da pericripta, têm sido mostrados pela literatura como responsáveis pela proliferação dos enterócitos das vilosidades, secretando fatores que estimulam a mitose nas criptas (BRITTAN, 2002; SHAO e SHENG, 2010). Essas células também são consideradas importantes no mecanismo que controla a integridade da unidade cripta-vilos. É sabido que os miofibroblastos da pericripta, que formam uma folha subjacente ao epitélio intestinal, podem modular a proliferação das células epiteliais intestinais e diferenciação, aumentar a resistência da barreira e modular as respostas secretoras do epitélio a vários agonistas como a acetilcolina ou prostaglandinas (NEUNLIST et al, 2007).

SHAO e SHENG (2010) com experimento em camundongos, demonstraram o importante papel dos miofibroblastos subepiteliais na composição do microambiente para a regeneração do epitélio intestinal, mostrando que após estímulo extracelular, essas células produzem uma variedade de fatores de crescimento epidermais, incluindo a Anfiregulina (AREG), que estimulam o crescimento do epitélio intestinal através de uma via parácrina.

Os fatores de crescimento secretados por miofibroblastos têm três ações: iniciar ou aumentar a mobilidade celular; induzir a proliferação; e induzir a diferenciação terminal das células, levando até mesmo à apoptose. Esses fatores podem agir de forma autócrina sobre os próprios miofibroblastos ou, através de uma forma parácrina, sobre as células epiteliais ou parenquimatosa do tecido em reparação (POWELL et all, 1999).

TSAI et al (1997) com experimento em camundongos, verificou que o Pepitídeo-2 Semelhante ao Glucagon (GLP-2), um hormônio produzido pelas células endócrinas no trato gastrointestinal, estimula o crescimento intestinal, aumenta a proliferação celular das criptas e diminui a apoptose dos enterócitos.

Trabalhando, também com camundongos, ØRSKOV et al (2005) concluiram que o GLP-2 age ligando-se ao seu receptor em miofibroblastos do intestino. Essas células secretam vários fatores de crescimento, um dos quais é KGF, que pode ser responsável

pelo crescimento das vilosidades do colon e em especial a proliferação de células caliciformes.

Nesse nosso segundo experimento, observamos que semelhantemente ao Experimento I, a Lactoferrina mostrou importante atividade no aumento do número e do tamanho dos miofibroblastos. A comparação entre os grupos CL e SL mostrou que o tipo de dieta não teve influência no número ($p > 0,05$) e no tamanho ($p > 0,05$) dos miofibroblastos, ou, seja, não houve influência da antigenicidade das proteínas da Soja e/ou de fatores antinutricionais, nos mecanismos de proliferação e/ou estimulação dos miofibroblastos. Isso significa que o papel dos miofibroblastos promoverem apoptose dos enterócitos (POWELL et al 1999), nesse caso é bastante discreto e que a atrofia das vilosidades se deve mais ao descarte das células no lúmen intestinal.

Apesar de haver um significante aumento no número de miofibroblastos para o grupo CL em comparação ao Ci, com $p < 0,001$ a favor da Lactoferrina, a comparação entre os grupos CL e SL ($p < 0,001$) significantemente maior para o grupo soja, mostra que deve existir um possível afeito sinérgico entre a Lactoferrina e algum outro fator, quando a mucosa está atrofiada e consequentemente há a necessidade do estímulo de proliferação mais intensa dos enterócitos. Diferentes citoquinas e fatores de crescimento são citados por POWELL et al (1999) como sendo ativadores ou estimulantes da proliferação de miofibroblastos. Entre esses fatores é citado o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico). HAGIWARA et al (1995), mostraram haver sinergismo da Lactoferrina com EGF na proliferação celular, em uma cultura de células intestinais de ratos.

Comparando-se os grupos SL e Si, encontramos valores altamente significantes a favor da Lactoferrina tanto para o número quanto para o tamanho dos miofibroblastos, indicando que realmente essa proteína tem importante atividade sobre essas células, que também se refletiu na proliferação dos enterócitos das vilosidades.

Esse resultado é condizente com os achados para outras proteínas, tais como: TSH (DROBNIK et al, 2009); Miostatina (CANTINI et al, 2008); Endotelina (NISHIDA et al, 2006); e Leptina (NAKAMURA et al, 2003).

7.3 Discussão do Experimento II – Parte 2: Estudo da Lactoferrina na cicatrização de anastomose em intestino delgado de ratos.

Situações e elementos que influenciam a cicatrização das anastomoses intestinais vêm sendo estudados já há bastante tempo, assim como fármacos e nutrientes que possam de algum modo ter ações benéficas como, por exemplo, a arginina (CORRÊA-NETO et al, 2009), vitaminas A e C (MEDEIROS et al, 2003) ou mesmo maléficas, como as mostradas pela nicotina (MEDEIROS et al, 1999) e antiinflamatórios (SIRIMARCO et al, 2001).

A grande maioria dos estudos em enteroanastomoses que utilizam ratos, como animal de experimentação, tem sido efetuada na região colônica, devido provavelmente, a essa apresentar maior incidência de patologias. Também, as reduzidas dimensões do segmento delgado, dificultam razoavelmente o procedimento cirúrgico. Inclusive se têm dado bastante interesse aos materiais cirúrgicos ou substâncias que consigam diminuir a incidência das aderências ou das deiscências, muito freqüentes e problemáticas nesse tipo de cirurgia, mesmo em humanos.

No nosso experimento, apenas como observação macroscópica clínica, somente um animal (A2) do grupo Ci apresentou uma pequena deiscência, sem solução de continuidade ao lume intestinal e, portanto, sem contaminação da cavidade peritoneal. Esse referido animal foi o que apresentou menor média de deposição do colágeno tipo I e o menor número de miofibroblastos. Dois animais desse mesmo grupo e um do grupo CL apresentaram leve aderência, as quais foram desfeitas com tração manual bastante suave. Isso indica que a técnica cirúrgica, assim como todos os demais procedimentos, foram bastante eficientes, uma vez que as deiscências e aderências seriam importantes fatores de complicação para o bom resultado desses atos cirúrgicos e consequentemente do experimento. Para minimizar o risco potencial de complicações, é imperativo respeitar vários princípios bem estabelecidos. Os principais dizem respeito à criação de uma tensão com boa aposição das bordas do intestino na presença de um suprimento de sangue excelente (GILLESPIE, 1983).

A escolha da técnica cirúrgica, no nosso experimento, foi alicerçada em estudos nos quais a mesma não motivou complicações na evolução clínica dos animais (BRITO et al, 2001; HOSGORLER et al, 2010; MANTZOROS et al, 2004). Minimizar a reação celular, a estenose luminal, a interferência com o fluxo sanguíneo da anastomose, e perturbação do metabolismo do colágeno, todos os que, potencialmente podem interferir no resultado do estudo é imprescindível (KORUDA e ROLANDELLI, 1990; PHILLIPS et al, 1992). A qualidade de um processo de cicatrização está diretamente ligada à fibroplasia assim como à síntese e deposição de colágeno que se iniciam nas primeiras 24 horas, pós-lesão, seguindo-se pela migração endotelial até 72 horas (ORGILL e DEMLING, 1988). Porém, STEFFENSEN, HÄKKINEN e LARJAVA (2001) mostraram em seu estudo sobre os eventos proteolíticos na cicatrização, que nas primeiras 24 horas após o ato cirúrgico, na verdade ocorre degradação da matriz intersticial, ou seja, do colágeno maduro, a fim de favorecer a migração de células para o local da lesão.

Por volta do quarto ao quinto dia inicia-se a produção e liberação de fatores de crescimento estimulando a neovascularização (ORGILL e DEMLING, 1988). As modificações no processo de cicatrização, na sua maioria, ocorrem até o sétimo dia de pós-operatório (HENDRICKS et al, 1990; NAYCI et al, 2001).

Nosso experimento mostrou diferença significante ($p < 0,001$) quanto ao número de vasos sanguíneos a favor grupo CL, indicando que a Lactoferrina pode favorecer a atividade metabólica exigida para as próximas fases do processo (GILLESPIE, 1983). MARTENS et al (1992), em um experimento com ratos, mostrou que a síntese de colágeno nas anastomoses intestinais é bastante aumentada durante a primeira semana após a operação.

Embora as três fases clássicas de cicatrização foram originalmente estudadas na pele, elas existem em todos os tecidos, incluindo o trato gastrointestinal. Existem algumas diferenças significativas entre a cicatrização da pele e a gastrointestinal. O ambiente para a cicatrização de feridas é substancialmente diferente em uma anastomose devido à presença de tensão tangencial (secundária ao trânsito da massa intraluminal e peristaltismo), assim como as bactérias aeróbias e anaeróbias.

A interligação entre as fibras de colágeno e sua orientação são os principais fatores que determinam a resistência à tração dos tecidos. Nosso presente estudo mostrou aumento altamente significante no número de miofibroblastos, assim como na área dos mesmos com $p < 0,001$ a favor do grupo suplementado com Lactoferrina (CL) tendo como conseqüência, também um significativo aumento na deposição do colágeno tipo I e colágeno tipo III com $p < 0,001$, nesse grupo. A colagenização, ou seja, a deposição total de colágeno, consequentemente foi também mais significante a favor do grupo Lactoferrina mostrando valor de $p < 0,001$. Esses dados indicam que as anastomoses dos animais suplementados com Lactoferrina estão mais adiantadas no processo de cicatrização e também com melhor capacidade de suportar as pressões ou trações a que possam ser submetidas, assim, com menor risco de sofrerem deiscência.

Esses resultados quanto ao número de miofibroblastos, colágenos tipo I e tipo III, são condizentes aos de KOSMIDIS et al, (2011) no estudo dos miofibroblastos e anastomose colônica em ratos Wistar e aos encontrados por DA COSTA et al, (2003) no experimento sobre o efeito do uso oral de glutamina na cicatrização, também de anastomose colônica em ratos. Resultados semelhantes sobre colagenização, foram mostrados por MEDEIROS et al, (2003) no estudo sobre os efeitos das vitaminas A e C em anastomoses intestinais de ratos tratados com corticosteróide e por SHASHIDHARAN et al, (1999) no estudo do efeito da suplementação de Arginina na anastomose colônica em ratos.

Outros dados que indicam o progresso temporal do processo, são os relativos ao número de células polimorfonucleares em relação às mononucleares, como já citado anteriormente no experimento I. Esse nosso segundo experimento mostrou, também, diferença bastante significante entre o número dessas células. Os polimorfonucleares foram predominantes no grupo não suplementado (Ci) quando comparados ao grupo CL ($p < 0,001$). Inversamente, no grupo CL prevaleceram as células mononucleares ($p < 0,001$) de um modo mais significante. Além de essas informações indicarem, também, que o processo no grupo CL está mais adiantado, sabe-se hoje que os mononucleares, como os mastócitos, têm importante papel na reparação tecidual, produzindo e liberando citoquinas que agem na desgranulação, favorecendo a boa deposição e organização do colágeno

maduro (tipo I). Isso foi bem demonstrado por CONNEELY et al. (2004), em um experimento com ratos, onde as anastomoses colônicas foram estudadas no quarto dia do processo.

7.4 Discussão das Análises de Regressão e Correlação

As análises de Regressão e de Correlação nos três diferentes episódios estudados mostraram relação direta, principalmente, entre o uso da Lactoferrina e o Número de Miofibroblastos e consequentemente relações indiretas com importantes atividades dessas células no reparo tecidual. A participação dos miofibroblastos na produção dos colágenos, a importância destes na resistência da área lesada e o papel dessas células na contração das feridas estão bem alicerçadas na literatura (MARTENS et al,1992; SCHURCH, SEEMAYER e GABBIANI, 1998; HINZ et al. 2001; LORENA et al. 2002;; DA COSTA et al, 2003; MEDEIROS et al, 2003; KOSMIDIS et al, 2011).

Também foram mostradas por essas análises relações entre o uso da Lactoferrina e o desenvolvimento de Tecido Epitelial e entre essa proteína e o surgimento de Vasos Sanguíneos. Nesses dois casos fica difícil estabelecer se houve relação direta ou indireta uma vez que experimentos "*in vitro*" como os efetuados por CHEN et al (2006) e TANG et al (2010), demonstraram a propriedade da Lactoferrina em estimular o crescimento no número de queratinócitos. HAGIWARA et al (1995), também mostrou haver ação da Lactoferrina na proliferação de células intestinais "*in vitro*". Por outro lado POWELL (1999) relata em seu estudo que os miofibroblastos produzem e secretam citocinas (citoquinas) e fatores de crescimento como HGF e KGF, entre outros, que são fatores estimulantes da proliferação de células epiteliais. Também ØRSKOV et al (2005) trabalhando com camundongos concluiram que miofibroblastos do intestino secretam vários fatores de crescimento, um dos quais é KGF, que pode ser responsável pelo crescimento das vilosidades do colon. Em relação aos vasos sanguíneos, CHINTALGATTU (2003) revelou em seu estudo que miofibroblastos produziam VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial) em lesões do coração. No entanto NORRBY (2004) demonstrou que a Lactoferrina humana aumentava significativamente a angiogênese, no seu estudo nas feridas de ratos.

8 CONCLUSÃO

A Lactoferrina na dose de 100µg/mL utilizada em processo de cicatrização de feridas cutâneas, por segunda intenção, em coelhos, influencia positivamente na reparação dos tecidos nas seguintes maneiras:

1 - Aumenta o número de células mononucleraes.

2 - Aumenta a angiogênese.

3 - Aumenta a proliferação fibroblástica.

3 - Aumenta a proliferação e o tamanho de miofibroblastos.

4 - Intensifica a colagenização, principalmente a deposição de colágeno tipo I (maduro) favorecendo a força de resistência da cicatriz.

5 - Reduz mais rapidamente a área da ferida e consequentemente o tempo de cicatrização.

6 - Intensifica a reepitelização.

A Lactoferrina administrada oralmente na dose de 200 mg/kg/dia a ratos submetidos à atrofia da mucosa intestinal mostra as seguintes ações:

1 - Aumenta o número e tamanho dos miofibroblastos da pericripta.

2 - Estimula rapidamente a regeneração das vilosidades atrofiadas.

A Lactoferrina administrada oralmente na dose de 200 mg/kg/dia a ratos submetidos à enteroanastomose do intestino delgado, atua positivamente no processo de cicatrização pelos seguintes modos:

1 - Aumenta o número de células mononucleares.

2 - Aumenta a angiogênese.

3 - Aumenta a proliferação e o tamanho de miofibroblastos.

4 - Intensifica a colagenização, principalmente a deposição de colágeno tipo I (maduro) favorecendo a força de resistência da cicatriz à pressão do conteúdo do lume intestinal, reduzindo assim o risco de deiscências.

Assim sendo, a Lactoferrina se mostra um relevante agente terapêutico e nutracêutico em diferentes situações de injúria tecidual, abrindo caminho para novas pesquisas em diversas especialidades medicas e nutricionais.

9 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEE, G.L.; TOUCHETTE, K.J. Efectos de la Nutricion Sobre la Salud Intestinal y el Crescimiento de Lechones. **Avances en Nutrición y Alimentación Animal,** FEDNA p.125-144, 1999.

ASFAR, S. **et al.** Effect of Green Tea in the Prevention and Reversal of Fasting-Induced Intestinal Mucosal Damage. **Nutrition,** v.19, n. 6, p. 536-540, 2003.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm,** v. 41 n.1, 2005.

BALLARD, F. J. **et al.** Insulin-like growth factors 1 and 2 in bovine colostrum. Sequences and biological activities compared with those of a potent truncated form. **Biochem J,** *v*. 251, n.1, p.95–103, 1988.

BATES, D.O.; JONES, R. O. P The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **Lower Extremity Wounds,** v. 2, n. 2, p.107–120, 2003.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. **Dermatol Surg**, v.31, p.674-686, 2005.

BELFORD, D. A. **et al.** Milk-Derived Growth Factors As Serum Supplements For The Growth Of Fibroblast And Epithelial Cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol,** v. 31, n.1, p.752-760, 1995.

BOLD, E. L. **et al.** The Use of Fibrin Glue in the Healing of Skin Flaps. **American Journal of Otolaryngology,** v.17, p. 27-30, 1996.

BONOMO, S. R. **et al.** Enhancement of Wound Healing by Hyperbaric. Oxygen and Transforming Growth Factor ß3 in a New Chronic Wound Model in Aged Rabbits. **Arch. Surg,** v.135 p.1148-1153, 2000.

BRITO, M. V.H. **et al**. Efeito do choque hipovolêmico na anastomose do intestino delgado de ratos. **Arq. Gastroenterol**., v.38, n.2, p.116-124, 2001.

BRITTAN, M. **et al**. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. **Gut a Journal of Gastr. and Hepat**. v. 50, p.752-757, 2002.

BUSSOLINO, F. **et al**. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. **The Journal of Cell Biology**, v.119, n.3, p. 629-641, 1992.

CANTINI, L. P. **et al** Profibrotic Role of Myostatin in Peyronie's Disease. J Sex Med. v.5, p.1607–1622, 2008.

CARUSO, M.; DEMONTE, A. Histomorfometria do Intestino Delgado de Ratos Submetidos a Diferentes Fontes Protéicas. **Alim. Nutr,** v.16, n.2, p.131-136, 2005.

CHEN, J. **et al**. Lactoferrin promotes human skin keratinocyte proliferation. **19th Annual Symposium on Advanced Wound Care**, 2006.

CHEN, S. **et al.** Wound healing effects of cactus extracts on second degree superficial burned mice. **Journal of Medicinal Plants Research,** v. 5, n.6, p. 973-978, 2011.

CHINTALGATTU, V. **et al**. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology,** v.35, p.277–286, 2003.

COELHO-LEMOS, **et al.** In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **J. Parenter Enteral Nutr,** v.28, n.4, p.241-4, 2004.

COLLIN, P.; KAUKINEN, K.; VÄLIMÄKI, M.; SALMI, J. Endocrinological disorders and celiac disease. **Endocr Rev,** v.23, n.4, p.464-483, 2002.

CONNEELY, J. B.; WINTER, D.; DOWDALL, J.; BOUCHIER-HAYES, D. Mast cell function is essential to intestinal anastomosis healing. **Journal of the American College of Surgeons,** v.199, n.3, p.21, 2004.

CONNEELY, O. M. Antiinflammatory Activities of Lactoferrin. **Journal of the American College of Nutrition,** v.20, n.5, p.389S–395S, 2001.

CORNISH, J. Lactoferrin promotes bone growth. **Biometals,** v.17, n.3, p.331-35, 2004.

CORNISH, J. **et al.** Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation in Vivo. **Endocrinology,** v.145, n.9, p.4366–4374, 2004.

CORRÊA-NETO, M. P. **et al.** Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. **Arq. Bras. Cir. Dig,** v.22, n.1 p.7-14, 2009.

COWIN, A. J. **et al.** Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. **Cell and Tissue Research,** v.306, n.2, 2001.

DA COSTA, M. A. **et al.** Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **J Parenter Enteral Nutr**, v.27, n.23, p.182-186, 2003.

DAENZER, M.; PETZKE, K.J.; BEQUETTE, B.J.; METGES, C.C**.** Whole-Body Nitrogen and Splanchnic Amino Acid Metabolism Differ in Rats Fed Mixed Diets Containing Casein or Its Corresponding Amino Acid Mixture. **J.Nutr,** v.131, p.1965-1972, 2001.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest,** v. 63, p.21-29, 1990.

DEMONTE, A. Caracterização por Métodos Químicos e Imunoquímicos da Glicinina da Soja (*Glycine Max L*.) Submetida a Modificação de Temperatura e pH. 1993, 91p. Tese (Doutorado em Bioquímica) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, 1993.

DESMOULIÈRE, A.; GUYOT, C., GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblasts: a key player in the controlo f tumor cell bahavior. **Int J Dev Biol,** v. 48, n.5-6, p.509-517, 2004.

DIEGELMANN, R. F.; ROTHKOPF, L. C.; COHEN, I. K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. **J. Surg. Res,** v.19, p.239-243, 1975.

DROBNIK, J. **et al.** Experimental hypothyroidism increases content of collagen and glycosaminoglycans in the heart. **Journal of Physiology and Pharmacology,** v.60, n.3, p.57-62, 2009.

DUMAS, B.R.; BRIGNON, G.; GROSCLAUDE, F.; MERCIER, J.C. Primary structure of bovine beta casein. Complete sequence. **Eur.J. Biochem,** v.25, p.505-514, 1972.

EHRLICH H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen,** v.4, p.203-206, 1996.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.514-525, 2007.

ESAGUY, N. **et al.** Lactoferrin triggers in vitro proliferation of T cells of Lewis rats submitted to mycobacteria-induced adjuvant arthritis. **Scandinavian Journal of Immunology,** v.38, n.2, p.147-152, 1993.

FLANIGAN, K.H. Nutritional Aspects of Wound Healing. **Adv Wound Care.** v.10, n.2, p.48-52, 1997.

FLECKNELL, P. A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **Br. J. Anaesth,** v.71, p.885-894, 1993

FORREST, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing [review]. **Br. J. Surg,** v.70, p.133-142, 1983.

FRITSCH, C **et al.** Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. **The Journal of Clinical Investigation,** v.110, n.11, p.1629-1641, 2002.

GABBIANI G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **Am J Pathol,** v.200, p.500-503, 2003.

GAFFNEY, E. A.; PUGH, K.; MAINI, P. K.; ARNOLD, F. Investigating a simple model of cutaneous wound healing. **J. Math. Biol**, v.45, p.337-374, 2002.

GARCIA, V. **et al.** Effect of Formic Acid and Plant Extracts on Growth, Nutrient Digestibility, Intestine Mucosa Morphology, and Meat Yield of Broilers. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, p.555-562,. 2007.

GEORGE, L. L.; CASTRO, R.R.L. **Histologia Comparada**. 2ª ed. - São Paulo: Roca, 1998. 286p.

GILLESPIE, I. E. Intestinal Anastomosis. **Br Med J**, (Clin Res Ed). v.286, p.1002, 1983.

GLEREAN, A. **Manual de Histologia: Texto e Atlas** - São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 223p.

GÖKE, M.; KANAI, M.; PODOLSKY, D. K. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v.274, p.G809-G818, 1998.

GUO, L.; DEGENSTEIN, L.; FUCHS, E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. **Genes & Development,** v.10, p.165-175, 1996.

GRINNEL, F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. **J. Cell. Biol,** v.124, n.4, p. 401-404, 1994.

HAGIWARA, T **et al**. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry,** v.59, n.10, p.1875-1881, 1995.

HASAN, W. **et al.** Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. **Cell Tissue Res**, v. 300, p. 97–109, 2000.

HAUKIPURO, K. **et al.** Synthesis of Type I Collagen in Healing Wounds in Humans. **Ann. Surg,** v.213, n.1, p.75-80, 1991

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W.J. Healing of experimental intestinal anastomosis: parameters for repair. **Dis Colon Rectum,** v.30, p.891-901, 1990.

HINTERLEITNER, T. A. **et al**. IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl secretion in T84 cells. **Am J Physiol,** v.271, p.C1262–C1268, 1996

HINZ, B.; MASTRANGELO, D.; ISELIN, C. E.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am. J. Pathol,** v.159, n.3, p.1009-1020, 2001.

HOSGORLER, F. U. Carnitine Protects the Intestine Against Reperfusion Injury in Rats. **Journal of Surgical Research**, v.159, p. 603–610, 2010

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

HÜBNER, G. **et al.** Strong Induction of Activin Expression after Injury Suggests an Important Role of Activin in Wound Repair. **Developmental Biology,** v.173**,** p.490–498, 1996.

IGARASHI, A. **et al.** Regulation of Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Human Skin Fibroblasts and During Wound Repair. **Molecular Biology of the Cell,** v. 4, p. 637-645, 1993.

ILLEMANN, M **et al.** Leading-Edge Myofibroblasts in Human Colon Câncer Express Plasminogen Activator Inhibitor-1. **Am J Clin Pathol,** v.122, p.256-265, 2004.

JOBSON, T. M.; BILLINGTON, C. B.; HALL, I.P. Regulation of Proliferation of Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts by Mediators Important in Intestinal Inflammation. **J. Clin. Invest,** v.101, n.12, p.2650–2657, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , 1999. 427p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differntial staing of collagen type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Arch. Histol. JPN,**, v.41, p.267-274, 1978.

KILSHAW, P..J. ; SLADE, H. Villus atrophy and crypt elongation in the small intestine of preruminant calves fed with heated soyabean flour or wheat glúten. **Res Vet Sci,** v.33, n.3, p.305-308, 1982.

KNIGHTON, D. **et al.** Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science,** v. 221, p.1283-1285, 1983.

KING, M. R. **et al.** Dietary bovine colostrum increases villus height and decreases small intestine weight in early-weaned pigs. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences,** v. 21, n.4, p.567-57, 2008.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R. H. Experimental Studies on the Healing of Colonic Anastomoses. **Journal of Surgical Research,** v.48, p.504-515, 1990.

KOSMIDIS, C. **et al.** Myofibroblasts and colonic anastomosis healing in Wistar rats. **BMC Surgery,** 11:6, 2011.

KUWATA, H. **et al.** Functional Fragments of Ingested Lactoferrin Are Resistant to Proteolytic Degradation in the Gastrointestinal Tract of Adult Rats. **J Nutr,** v.131, n.8, p.2121-2127, 2001.

KWON, Y. B. **et al.** Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. **J. Vet Sci,** v.72, n.2, p.105-109, 2006.

LABIOCEL USP **Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celula**r - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002. 154p.

LEE, D.N. **et al.** Effects of diets supplemented with recombinant epidermal growth factor and glutamine on gastrointestinal tract development of early-weaned piglets. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences,** v.21, n.4, p.582-589, 2008.

LI, A. K. C. **et al.** Nerve growth factor: Acceleration of the rate of wound healing in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.77, n.7, p.4379-4381, 1980.

LI, D.F.; NELSSEN, J.L.; REDDY, P.G. Transient hipersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. **J. Anim. Sci,** v.68, p.1790-99, 1990.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.9-18, 2007.

LIENER, I.E. Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. **Critical Reviews in Food Sci. and Nutr,** v.34, p.31-67, 1994.

LORENA, D. **et al.** Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair Regen,** v.10, n.2, p.86-92, 2002.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de Proteínas de Alimentos**. – Jaboticabal : Funep, 2000. 344p.

MADDEN, J. W.; PEACOCK JR, E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. **Ann Surg,** v.174, n.3, p.511-518, 1971.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E.P. Mandelbaum, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An bras Dermatol,** v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MANN, A. **et al.** Keratinocyte-Derived Granulocyte±Macrophage Colony Stimulating Factor Accelerates Wound Healing: Stimulation of Keratinocyte Proliferation, Granulation Tissue Formation, and Vascularization. **J Invest Dermatol**, v.117, p.1382-1390, 2001.

MANTZOROS, I. **et al.** Effects of steroid on the healing of colonic anastomoses in the rat. **Tech Coloproctol,** v.8, p. S180–S183, 2004.

MARCHINI, F.B. et al. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. **Rev. Paul. Med**, v.106, n.6, p.356, 1988.

MARIKOVSKY, M. **et al.** Appearance of heparin-binding-EGF (HB-EGF) in wound fluid as a response to injury. **Proc Natl Acad Sci USA,** v.9, p.3889–3893, 1993

MARTENS, M.F.W.C. **et al.** Intraperitoneal cytostatics impair early post-operative collagen synthesis in experimental intestinal anastomoses. **Br. J. Câncer,** v.65, p.649-654, 1992

MAY, R.J. **et al.** A villous cell-derived inhibitor of intestinal cell proliferation. **Am J Physiol,** v.24, n.6, p.G520-G527, 1981.

MEDEIROS, A. C. **et al.** Efeitos das vitaminas A e C em anastomoses intestinais de ratos tratados com corticosteróide. **Acta Cir Brás**, v.18 n.1, p.28-32, 2003.

MEDEIROS, A. C. **et al.** Efeitos da Nicotina na Cicatrização Intestinal em Ratos. **Rev. Col. Bras. Cir,** v.26, n.6, p. 375-378, 1999.

MEYER, N.A. et al. Nutrient support of the healing wound. New Horiz; v.2, n.2, p.202-214, 1994.

NAKAMURA, M. **et al** Interaction of leptin with gastric myofibroblast transdifferentiation in Hp-infected Mongolian gerbils: effect of rebamipide. **Aliment Pharmacol Ther,** v.18, n.1, p, 99–105, 2003.

NAOT, D. **et al.** Lactoferrin – A Novel Bone Growth Factor. **Clinical Medicine & Research,** v.3, n. 2, p. 93-101, 2005.

NAYCI, A.L. **et al.** Comparison of electromagnetic field stimulation on the healing of small and large intestinal anastomosis. ***Dis Colon Rectum*****,** v.44, p.1181-1188, 2001.

NEUNLIST, M. **et al**. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-b1 dependent pathway. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v.292, p.G231-G241, 2007.

NISHIDA, T. **et al**. Endothelin-1, an ulcer inducer, promotes gastric ulcer healing via mobilizing gastric myofibroblasts and stimulates production of stroma-derived factors. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v.290, p.G1041–G1050, 2006.

NORRBY, K. Human Apo-Lactoferrin Enhances Angiogenesis Mediated by Vascular Endothelial Growth Factor A in vivo. **J Vasc Res,** v.41, p.293–304, 2004.

OGUCHI, S. **et al.** Iron saturation alters the effect of Lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells). **Biology of the Neonate,** v.67, n.5, p.330-339, 1995.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit. Care Med**, v.6, n.9, p.899-907, 1988.

ØRSKOV, C. **et al.** GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. **Regulatory Peptides,** v.124, p.105-112, 2005.

PANDARINATHAN, C., SAJITHLAL, G.B., CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 81, p.71-76, 1998.

PHILLIPS, J. D. **et al.** Effects of Chronic Corticosteroids and Vitamin A on the Healing of Intestinal Anastomoses. **The American Journal of Surgery**, v.163, p.71-77, 1992

PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A. Pharmacologic Enhancement of Wound Healing. **Annu. Rev. Med,** v.46, p.467-481, 1995.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. F. Milk growth factors as health products: Some technological aspects. **International Dairy Journal,** v.16, n.11, p.1415-1420, 2006.

POWELL, D. W. **et al.** Myofibroblasts: Paracrine cells important in health and disease. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 277, p. C1-C19, 1999.

POWELL, D. W. **et al.** Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v. 289, p. G2-G7, 2005.

RAMSEY, D. T. **et al.** Effects of tree occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **Am J Vet Res,** v..56, p.941-949, 1995.

RAYNER, T. E. **et al.** Mitogenic whey extract stimulates wound repair activity in vitro and promotes healing of rat incisional wounds. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol,** v.278, p.1651-1660, 2000.

READ-SNYDER, J. **et al**. Effect of Dietary Selenium on Small Intestine Villus Integrity in Reovirus-Challenged Broilers. **International Journal of Poultry Science,** v.8, n.9, p. 829-835, 2009.

RING, B. D. **et al.** Systeniically And Topically Adrninistered Leptin Both Acceterate Wound Healing In Diabetic ob/ob Mice. **Endocrinology - The Endocrine Society,** v.141, n.1, 2000.

ROBSON, M. C. Growth factors as wound healing agents. **Current Opinion in Biotechnology,** v.2, p.863-867, 1991.

ROSS, M.H.; HEITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia Texto e Atlas.** 2ª ed. - São Paulo: Panamericana, 1993. 779 p.

SAADA, J. I. **et al.** Subepithelial Myofibroblasts are Novel Nonprofessional APCs in the Human Colonic Mucosa. **J Immunol,** v.177, p.5968-5979, 2006.

SANCHEZ, L.; MIGUEL CALVO, M.; BROCK, J. H. Biological role of lactoferrin. **Arch.of Disease in Childhood,** v.67, p.657-661, 1992.

SCHOTTSTEDT, T. **et al.** Effects of Feeding Vitamin A and Lactoferrin on Epithelium of Lymphoid Tissues of Intestine of Neonatal Calves. **J. Dairy Sci,** v.88, p.1050–1061, 2005.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol,** v.22, n.2, p.141-147, 1998.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr,** v.17, n.4 , p.397-409, 2004.

SHAO, J. **et al.** Roles of Myofibroblasts in Prostaglandin E2–Stimulated Intestinal Epithelial Proliferation and Angiogenesis. **Cancer Res,** v.66, n.2, p. 846-855, 2006.

SHAO, J.; SHENG, H. Amphiregulin Promotes Intestinal Epithelial Regeneration: Roles of Intestinal Subepithelial Myofibroblasts. **Endocrinology Journ,** v.151, n.8, p.3728–3737, 2010.

SHASHIDHARAN, M. **et al.** Influence of Arginine Dietary Supplementation on Healing Colonic Anastomosis in the Rat. **Dis Colon Rectum,** v.42, n.12, p.1613-1617, 1999.

SHELTON, J.L. **et al.** Growth performance of different breed crosses of chicks fed diets with different protein and energy sources. **Poult Sci,** v.82, p.272-78, 2003.

SHIN, K. **et al.** Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. **Journal of Medical Microbiology,** v.54, p.717–723, 2005.

SIMÕES, M.J. **et al**. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Rev Paul Méd,** v.104, n.3, p.132-135, 1986

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med**, v.341, p.738-746, 1999.

SIRIMARCO, M.T.; ZUCOLOTO, S.; APRILLE, F. Estudo comparativo dos efeitos de dois corticosteróides sintéticos, Deflazacort e Prednisona, na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos. **Rev bras Coloproct,** v.21, n.3, p.167-195, 2001.

SORG, H **et al.** Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. **FASEB Journal,** v.23 p.3049-3058, 2009.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am J Surg,** v.176 (2A Suppl), p.26S-38S,1998.

STEFFENSEN, B.; HÄKKINEN, L.; LARJAVA, H. Proteolytic Events of Wound-Healing Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. **Crit Rev Oral Biol Méd,** v.12, n.5, p.373-398, 2001.

STEVANATO, M. B. Estudo da eficiência da Lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos. 2005. 145p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, 2005.

SUGUNA, L.; SIVAKUMAR, P.; CHANDRAKASAN, G. Effects of Centella asiatica extract on dermal wound healing in rats. **Indian J Exp Biol,** v.34, n.12, p.1208-1211, 1996.

SUZUKI, Y. A.; LONNERDAL, B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. **Biochem Cell Biol,** v.80, p.75-80, 2002.

TANG, L. **et al.** Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound re-epithelialization. **British Journal of Dermatology,** v.163, p.38–47, 2010.

TAVANO, O. L. Avaliação Nutricional de Frações Protéicas do Grão-de-Bico (Cicer arietinum L.) var. IAC-Marrocos- Estudo In Vivo e In Vitro. 2002. 94p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2002.

TOMASEK, J.J. **et al.** Myofibroblasts and Mechano-regulation of Connective Tissue Remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v.3, p.349-363, 2002

THOMSON, A. B. R.; KEELAN, M. The Development of the Small Intestine. **Can. J. Physiol. Pharmacol,** v.64, p.13-29, 1986.

THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; WILD, G.E. Nutrients and intestinal adaptation. **Clin. Invest. Med,** v.19, p.331-45, 1996.

THORNTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. In: Wound healing. **Surg Clin North Am,** v.77, n. 3, p.549 - 573, 1997.

TOGAWA, J-I. **et al.** Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. **J. of Gastr. and Hepatology,** v. 17, p.1291-1298, 2002.

TSAI, C. H.; HILL, M.; ASA, S. L.; BRUBAKER, P. L.; DRUCKER, D. J. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide- in mice. **Am. J. Physiol,** v..273, p.E77–E84, 1997.

VAN DER STRATE, B. W. A. **et al.** Antivirai activities of iactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, p. 225-239, 2001.

VARADHACHARY, A. **et al.** Oral Lactoferrin Inhibits Growth of Established Tumors and Potentiates Conventional Chemotherapy. **Int. J. Câncer,** v.111**,** p.398-403, 2004.

VOGEL, H. J. **et al.** Towards a structure–function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. **Biochem. Cell Biol,** v. 80, p.49-63, 2002.

VORLAND, L. H. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. **APMIS,** vol.107, p.971-981, 1999.

WAHEED, A. A.; GUPTA, P. D., Changes in Structural and Functional Properties of Rat Intestinal Brush Border Membrane During Starvation**. Life Sciences,** v.61, p.2425-33, 1997.

WANG, Y. **et al.** Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets. **J Anim Sci,** v. 84, p.2636-2641, 2006.

WELLS, C. L.; RHAME, F. S. Effect of oral dextran sulfate on the mouse intestinal tract. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr,** v.3, p.361-365, 1990.

WERNER, B.; CAMPOS, A. C.; NADJI. M.; TORRES, L. F. B. Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. **J Bras Patol Med Lab,** v.41, n.5, p.353-364, 2005.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiol Ver,** v. 83, p. 835–870, 2003.

WERNER, B. Indicações e contribuição diagnóstica da imunohistoquímica em patologia cirúrgica., 2002, 80p. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2002.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing**. Surg. Clin. N. Am,** v.77, n. 3, p.509-527, 1997.

YANAIHARA, A. **et al.** Cell proliferation effect of lacoferrin in human endometrial stroma cells. **Molecular Human Reproduction,** v.6, n.5, p.469-473, 2000.

YORIO, T.; CLARK, A. F; WAX, M. B. **Ocular Therapeutics: Eye on New Discoveries**. London: Elsevier Academic Press, 2007. 536p.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Organização dos dados da Intensidade da Vascularização para o teste de Mann-Whitney.

Ordem	Vascularização	Postura	Posto	Posto FC	Posto FL
1	1.59	FC	1	1	
2	1.72	FC	2	2	
3	1.79	FC	3	3	
4	1.93	FC	4	4	
5	1.83	FC	5	5	
6	2.14	FL	6		6
7	2.15	FC	7	7	
8	2.17	FL	8		8
9	2.35	FL	9		9
10	2.36	FL	10		10
11	2.50	FL	11		11
12	2.58	FL	12		12

FC (N=6) vs. FL(N=6)

Mean ranks:	1.833	4.667
T=Ub:	1	
p(same):	0.008239	
Monte Carlo p:	0.0048	
Exact p:	0.004329	

Apêndice 2 – Médias da leitura dos 3 cortes, de cada lâmina, nas 3 observações para a avaliação da Intensidade da Proliferação Vascular.

Animais	**FC**	**FL**
1	2.15	2.50
2	1.59	2.14
3	1.93	2.58
4	1.83	2.17
5	1.79	2.35
6	1.72	2.36
Md ± sd	**1.84** ± 0.19	**2.35** ± 0.17

FC = Ferida Controle
FL = Ferida Lactoferrina
Md ± = Médias ± desvio padrão

Apêndice 3 - Organização dos dados da Intensidade da Proliferação Fibroblástica]

para o teste de Mann-Whitney

Ordem	Fibroplasia	Postura	Posto	Posto FC	Posto FL
1	1,18	FC	1	1	
2	1,45	FC	2	2	
3	1,73	FC	3	3	
4	1,93	FC	4	4	
5	1,98	FC	5	5	
6	2,15	FC	6	6	
7	2,17	FL	7		7
8	2,23	FL	8		8
9	2,29	FL	9		9
10	2,34	FL	10		10
11	2,49	FL	11		11
12	2,72	FL	12		12

A (N=6) vs. B(N=6) Mean ranks: 1,75 4,75

T=Ub: 0 Monte Carlo p: 0,0019 Exact p: 0,002165

p: 0,005

Apêndice 4 - Médias da leitura dos 3 cortes, de cada lâmina, na avaliação da Proliferação Fibroblástica.

Feridas	FC	FL
1	1.98	2.29
2	1.45	2.17
3	1.73	2.34
4	1.18	2.48
5	1.93	2.72
6	2.15	2.23
Md ± sd	**1.74** ± 0.36	**2.37** ± 0.20

FC = Ferida Controle
FL = Ferida Lactoferrina
Md ± = Médias ± desvio padrão

Apêndice 5 - Organização dos dados da Colagenização para o teste de Mann-Whitney e resultado

Ordem	Colagenização	Postura	Posto	Posto FC	Posto FL
1	1,06	FC	1	1	
2	1,18	FC	2	2	
3	1,43	FC	3	3	
4	1.47	FC	4	4	
5	1.68	FC	5	5	
6	1.86	FC	6	6	
7	1.97	FL	7		7
8	2.23	FL	8		8
9	2.24	FL	9		9
10	2.26	FL	10		10
11	2.54	FL	11		11
12	2.84	FL	12		12

FC (N=6) vs. FL(N=6)

Mean ranks:	1.75	4.75
T=Ub:	0	
p(same):	0.005075	
Monte Carlo p:	0.0019	
Exact p:	0.002165	

Apêndice 6 - Médias da leitura dos 3 cortes, de cada lâmina, na avaliação de Colagenização.

Ferida	FC	FL
1	1.68	2,24
2	1.47	1,97
3	1.06	2,26
4	1.18	2,54
5	1.86	2,84
6	1.43	2,23
Md ± sd	1.45 ± 0,29	2.35 ± 0,30

FC = Ferida Controle
FL = Ferida Lactoferrina
Md ± = Médias ± desvio padrão

Apêndice 7 - Organização dos dados da Reepetelização para o teste de Mann-Whitney e resultado

Ordem	Reepetelização	Postura	Posto	Posto FC	Posto FL
1	0.27	FC	1	1	
2	0.36	FC	2	2	
3	0.46	FC	3	3	
4	0.65	FC	4	4	
5	0.80	FC	5	5	
6	1.11	FL	6		6
7	1.27	FC	7	7	
8	1.37	FL	8		8
9	1.42	FL	8		9
10	1.43	FL	9		10
11	1.75	FL	10		11
12	2.21	FL	11		12

FC (N=6) vs. FL(N=6)

Mean ranks:	1.833	4.667
T=Ub:	1	
p(same):	0.008239	
Monte Carlo p:	0.0051	
Exact p:	0.004329	

Apêndice 8 - Médias da leitura dos 3 cortes, de cada lâmina, na avaliação da Reepitelização.

Ferida	FC	FL
1	0.80	1.37
2	0.65	1.11
3	0.36	2.21
4	0.27	1.75
5	1.23	1.42
6	0.46	1.43
Md ± sd	**0.63** ± 0.35	**1.55** ± 0.38

Apêndice 9 - Média dos dados de Polimorfonucleares e Mononucleares em percentagem (%)

FL Polimorfon.	37.44	34.91	39.37	42.09	41.96	42.63	
	34.13	37.67	41.77	35.25	36.21	34.41	
	34.29	35.48	35.98	34.15	36.57	37.09	**Md = 37.30**
md	**35.29**	**36.02**	**39.04**	**37.16**	**38.24**	**38.04**	**sd = 1.43**
sd	1.86	1.46	2.91	4.30	3.22	4.19	

FC Polimorfon.	46.35	46.86	48.36	47.50	49.09	47.92	
	47.05	46.10	47.98	50.83	48.68	47.11	
	50.26	49.24	48.07	47.98	55.12	48.78	**Md = 48.52**
md	**47.89**	**47.40**	**48.14**	**48.77**	**50.96**	**47.94**	**sd = 1.28**
sd	2.09	1.64	0.20	1.80	3.61	0.83	

FL Mononucle.	67.29	61.30	63.08	61.88	64.84	68.52	
	65.71	65.21	63.05	57.83	56.10	57.18	
	64.65	61.66	63.33	59.87	64.25	63.70	**Md = 62.75**
md	**65.89**	**62.72**	**63.15**	**59.86**	**61.73**	**63.13**	**sd = 1.98**
sd	1.33	2.16	0.15	2.02	4.88	5.69	

FC Mononucle.	51.02	49.17	53.62	50.94	52.44	56.59	
	58.37	52.39	49.77	51.77	46.94	49.19	
	54.74	49.74	52.38	51.17	49.01	50.54	**Md = 51.66**
md	**54.71**	**50.44**	**51.93**	**51.29**	**49.46**	**52.11**	**sd = 1.79**
sd	3.67	1.72	1.96	0.43	2.78	3.94	

Apêndice 10 - Médias da análise dos 3 campos para Deposição de Colágeno Tipo I, Colágeno Tipo III e do Índice de Maturação do Colágeno.

Animal	Colágeno Tipo I		Colágeno Tipo III		IMaC	
	FC	FL	FC	FL	FC	FL
1	40,19	50.19	49,81	48.83	0,95	1,02
2	36,79	50.07	53,90	47.57	0,73	1,05
3	41,02	50.42	49,22	48.93	0,89	1,03
4	43,87	51.31	50,14	50.70	0,8	1,01
5	47,32	51.80	51,12	51.31	0,72	1,00
6	39,16	50.08	50,06	48.19	0,82	1,04
Médias ± DP	41,39 ± 3,53	50,65 ± 1,14	50,71 ± 1,68	49,26 ± 1,45	0,82 ± 0,09	1,03 ± 0,02

Apêndice 11 – Médias do número de miofibroblastos das três lâminas de cada ferida

	Animais						
	1	2	3	4	5	6	
FC							
	20,85	20,72	21,45	21,13	20,89	20,90	
	21,18	21,70	21,07	20,76	21,24	21,08	
	20,90	21,47	21,31	20,93	21,15	20,96	Md ± sd (FC)
md	**20,98**	**21,30**	**21,28**	**20,94**	**21,09**	**20,98**	21,09 ± 0,27
sd	0,18	0,51	0,19	0,19	0,18	0,09	
FL							
	23,15	23,19	24,20	23,66	23,99	24,10	
	23,04	23,04	22,14	24,06	23,68	22,48	
	23,64	23,03	23,88	22,56	23,84	23,01	Md ± sd (FL)
md	**23,27**	**23,09**	**23,41**	**23,43**	**23,84**	**23,20**	23,37 ± 0,61
sd	0,32	0,09	1,11	0,78	0,15	0,83	

Md ± sd (FC) = médias de todas a leituras do grupo Controle ± desvio padrão

Md ± sd (FL) = médias de todas a leituras do grupo Lactoferrina ± desvio padrão

Apêndice 12 – Médias das áreas dos miofibroblastos das lâminas de cada ferida

	Animais					
	1	2	3	4	5	6
FC	153,79	158,86	160,78	166,53	163,03	160,58
	155,42	157,25	158,09	162,55	162,07	163,18
	155,89	157,50	160,08	158,46	161,43	163,95
	157,41	159,96	156,02	167,91	162,74	162,31
	161,28	162,94	153,44	164,36	161,51	164,43
	159,44	159,72	159,96	163,41	160,12	162,74
	154,55	155,97	164,57	173,99	159,60	158,88
	156,14	156,43	161,61	175,29	158,75	163,78
	162,39	157,97	162,94	176,36	158,24	166,95
	170,61	158,65	164,34	168,44	161,82	164,67
	170,18	161,29	159,61	163,24	160,81	160,30
	167,77	163,28	157,45	159,40	157,63	157,53
	164,97	164,19	158,05	163,78	160,30	157,10
	167,64	162,10	157,65	170,08	162,52	160,74
	172,87	159,60	160,00	160,76	161,86	166,10
	166,51	162,49	162,50	154,67	160,78	163,69
	159,14	163,41	159,77	154,79	161,01	159,63
	156,71	161,81	161,93	160,57	162,42	158,90
	164,85	158,92	163,14	170,46	161,83	159,21
	170,14	157,70	160,44	170,15	160,91	158,98
Md ± sd (FC)						
161,74 ± 4,43						
FL	175,45	169,35	177,82	177,20	174,69	171,37
	168,47	165,61	176,84	174,76	181,47	171,11
	181,97	178,59	167,84	170,54	187,62	175,30
	180,97	183,83	169,40	163,99	181,02	178,47
	170,45	172,55	176,83	163,45	177,71	180,53
	178,23	172,76	186,89	168,32	177,88	181,98
	184,51	183,82	179,19	173,35	179,12	178,18
	176,26	172,81	179,51	171,76	169,32	172,26
	182,30	162,92	177,43	164,83	177,73	179,67
	173,10	175,35	181,38	172,22	179,85	184,02
	174,69	176,89	173,31	174,27	170,26	186,70
	187,37	169,62	179,93	171,25	167,16	173,32
	184,78	173,49	183,97	182,48	173,88	186,69
	182,76	173,26	186,85	178,93	177,44	179,40
	178,97	176,91	183,43	174,10	172,96	177,03
	181,08	181,01	182,40	174,07	172,62	181,76
	191,22	172,03	175,21	170,87	172,78	181,16
	187,81	163,71	173,96	165,75	176,29	177,44
	186,86	159,92	174,53	160,28	177,34	167,76
	185,75	165,21	164,65	166,79	180,17	166,48
Md ± sd (FL)						
175,93 ± 6,61						

Md ± sd (FC) = médias de todas a leituras do grupo Controle ± desvio padrão

Md ± sd (FL) = médias de todas a leituras do grupo Lactoferrina ± desvio padrão

Apêndice 13: médias dos pesos dos animais (g)

Grupos	*PA1*	*PA5*	*PA10*	*PA15*
SL	124,21 ± 0,99	128.15 ± 1,01	142,84 ± 1,15	154,89 ± 1,24
CL	124,04 ± 1,21	133,22 ± 1,30	145,38 ± 1,42	155,42 ± 1,52
Si	124,10 ± 1,03	125,83 ± 1,05	134,38 ± 0,91	140,11 ± 1,17
Ci	124,11 ± 0,82	131,75 ± 0,65	144,96 ± 0,72	155,01 ± 0,77

PA1, PA5, PA10 e PA15 = médias dos pesos dos animais no 1º, 5º, 10º e 15º dias respectivamente.

Apêndice 14 - Médias por animal,do comprimento das vilosidades em µm.

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD(G)**
MCV (CL)	212,23	276,76	225,92	260,45	228,07	216,97	**236,73 ± 33,32**
SD	37,68	35,95	24,48	28,69	39,07	34,02	
MCV (Ci)	211,77	276,31	225,46	259,99	221,75	216,52	**235,30 ± 32,95**
SD	37,43	36,14	24,72	28,33	37,09	33,99	
MCV (SL)	180,12	243,18	195,68	229,25	190,12	196,16	**205,75 ± 32,95**
SD	37,43	36,14	24,72	28,33	37,09	33,98	
MCV (Si)	161,88	139,83	154,20	161,00	164,14	145,89	**154,49 ± 31,87**
SD	22,87	32,37	31,17	32,88	31,88	34,87	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MCV: (CL), (Ci), (SL) e (Si) = média do comprimento das vilosidades por animal.

MD±SD (G) = média dos comprimentos das vilosidades por grupo. ± Desvio Padrão

Apêndice 15 – Médias das profundidades das criptas (PC) em µm.

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MPC (CL)	52,87	48,62	49,42	46,54	44,09	50,87	**48,73 ± 11,80**
SD	14,21	12,43	13,37	10,08	11,24	9,77	
MPC (Ci)	53,67	50,66	47,73	51,82	44,87	53,31	**50,34 ± 11,98**
SD	14,55	12,05	13,37	10,59	11,24	10,08	
MPC (SL)	56,70	51,93	46,58	58,64	45,83	57,33	**52,83 ± 11,98**
SD	13,11	10,89	11,24	12,44	8,57	10,98	
MPC (Si)	88,68	164,62	117,98	100,92	140,47	88,99	**116,94 ± 37,57**
SD	11,57	42,81	13,97	19,51	38,62	5,91	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MPC: (CL), (Ci), (SL) e (Si) = média da profundidade das criptas por animal.

MD±SD (G) = média das profundidades das criptas por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 16 : médias dos números de miofibroblastos (NMf)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
NMf (C+L)	5,65	5,69	5,34	5,34	6,00	5,10	**5,52 ± 1,48**
SD	1,55	1,55	1,51	1,37	1,37	1,45	
NMf (C-L)	4,41	4,31	4,30	4,55	4,11	4,57	**4,38 ± 1,54**
SD	1,62	1,67	1,36	1,48	1,49	1,67	
NMf (S+L)	6,38	6,29	6,48	6,08	6,40	6,25	**6,31 ± 1,57**
SD	1,66	1,63	1,52	1,54	1,69	1,40	
NMf (S-L)	4,44	4,30	4,45	4,02	4,15	4,20	**4,26 ± 1,30**
SD	1,33	1,32	1,18	1,25	1,27	1,45	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

NMf: (C+L), (C-L), (S+L) e (S-L) = médias dos números de miofibroblastos por animal.

MD±SD (G) = média dos números de miofibroblastos por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 17: médias das áreas dos miofibroblastos (AMf)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
AMf (C+L)	167,33	162,88	166,95	160,50	163,73	163,42	**164,13 ± 6,47**
SD	6,32	6,82	6,65	5,64	5,41	5,91	
AMf (C-L)	153,49	151,11	151,23	156,37	152,08	152,79	**152,85 ± 4,43**
SD	6,19	2,52	2,81	6,31	1,50	2,87	
AMf (S+L)	166,95	158,16	163,91	156,64	162,43	163,89	**161,99 ± 6,99**
SD	6,40	6,73	6,63	5,60	5,45	6,01	
AMf (S-L)	154,70	153,04	153,29	152,33	150,90	155,16	**153,24 ± 5,66**
SD	5,61	6,23	5,94	5,37	4,85	5,45	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

AMf: (C+L), (C-L), (S+L) e (S-L) = médias das áreas de miofibroblastos por animal.

MD±SD (G) = média dos números de miofibroblastos por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 18: médias dos números de células polimorfonucleares (CPn)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MCPn (C-L)	106.15	106.16	103.83	105.64	108.44	106.73	**106,16 ± 1.58**
SD	0.60	0.51	0.72	0.98	0.94	0.84	
MCPn (C+L)	91.48	90.94	89.50	93.32	91.63	93.44	**91,72 ± 1.61**
SD	1.02	0.80	0.96	0.81	0.97	0.64	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MCPn: (C+L) e (C-L) = Médias dos números de células polimorfonucleares por animal.

MD±SD (G) = Média dos números de células polimorfonucleares por grupo ± Desvio Padrão

Apendice 19 - médias dos números de células mononucleares (CMn)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MCMn (C-L)	83.84	81.48	82.93	81.71	85.98	82.43	**83,06 ± 1,69**
SD	0.74	0.60	0.96	0.48	0.57	0.95	
MCMn (C+L)	122.14	125.79	123.94	123.94	123.91	125.22	**124,15 ± 1,39**
SD	0.74	0.69	0.76	0.74	0.98	0.68	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MCMn: (C+L) e (C-L) = Médias dos números de células mononucleares por animal.

MD±SD (G) = Média dos números de células mononucleares por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 20 : médias dos números de miofibroblastos (Mf)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MNMf(C-L)	7.88	8.05	7.60	7.95	8.05	7.90	**7.90 ± 0.92**
SD	0.99	0.71	0.76	0.84	0.97	1.18	
MNMf (C+L)	10.08	9.79	10.13	10.14	10.03	10.06	**10.04 ± 0.86**
SD	0.94	0.80	0.99	0.74	0.82	0.87	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MNMf: (C+L) e (C-L) = Médias dos números de miofibroblastos por animal.

MD±SD (G) = Média dos números de miofibroblastos por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 21 - médias das áreas dos miofibroblastos (Mf)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MAMf(C-L)	148.09	150.71	146.82	149.83	150.31	149.37	**149.19 ± 6.89**
SD	7.24	4.56	7.45	7.04	6.50	8.07	
MAMf (C+L)	160.21	160.48	160.14	161.02	161.77	160.54	**160.69 ± 6.09**
SD	5.38	5.24	7.61	5.07	7.53	5.80	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MAMf: (C+L) e (C-L) = Médias das áreas dos miofibroblastos por animal.

MD±SD (G) = Média das áreas dos miofibroblastos por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 22 - médias dos números de vasos sanguíneos (VSg)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MNVSg (C-L)	7.98	7.67	7.77	7.70	7.28	7.17	**7,59 ± 0,99**
SD	0.87	0.99	1.09	0.94	1.08	0.74	
MNVSg (C+L)	9.18	8.42	9.28	9.46	8.63	9.02	**8,99 ± 1.04**
SD	1.20	1.26	0.89	0.85	0.71	0.91	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MNVSg: (C+L) e (C-L) = Médias dos números de vasos sanguíneos por animal.

MD±SD (G) = Média dos números de vasos sanguíneos por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 23 - médias das intensidades de colágeno tipo I (Ct-I)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MICt-I (C-L)	**56,20**	**53.38**	**60.19**	**57.82**	**61.83**	**63.54**	**58.82 ± 3.56**
SD	0.89	0.93	0.86	0.98	0.97	0.76	
MICt-I (C+L)	**66.92**	**67.76**	**73.28**	**68.49**	**72.31**	**69.04**	**69.63 ± 2.70**
SD	1.61	1.49	1.31	1.55	1.02	0.92	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MICtI: (C+L) e (C-L) = Médias da intensidade de Colágeno tipo I por animal.

MD±SD (G) = Média das intensidades de Colágeno tipo I por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 24 - médias das intensidades de colágeno tipo III (Ct-III)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MICt-III (C-L)	26.37	32.91	38.11	29.30	30.37	32.06	**31.52 ± 3.77**
SD	0.89	1.02	0.93	1.11	1.25	0.94	
MICt-III (C+L)	34.67	30.94	36.45	37.12	31.01	31.52	**33.62 ± 2.79**
SD	1.22	1.40	0.68	0.98	1.01	0.91	

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MICtIII: (C+L) e (C-L) = Médias da intensidade de Colágeno tipo III por animal.

MD±SD (G) = Média das intensidades de Colágeno tipo III por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 25 - médias da deposição de colágeno total – Colagenização (Clg)

Grupos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	**MD ± SD (G)**
MClg Ci	79.75	89.11	98.29	87.11	92.19	95.60	**90,34** ± 6,61
MClg CL	103.33	98.70	105.61	109.72	100.57	101.59	**103.25** ± 3,95

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 = animais do grupo

MClg (C+L) e (C-L) = Médias da Colagenização por animal.

MD±SD (G) = Média Colagenização por grupo ± Desvio Padrão

Apêndice 26 – Composição das Rações.

Componentes (AIN-93)	(g) p/ 1 kg de ração soja	(g) p/ 1 kg de ração caseína
Proteína.....20%	295,5	235,0
Sacarose.....10%	100,0	100,0
Óleo.....7%	70,0	70,0
Fibra.....5%	50,0	50,0
Mistura Mineral.....3,5%	35,0	35,0
Mistura Vitamínica.....1%	10,0	10,0
Bitartarato de Colina.....0,25%	2,5	2,5
Amido.....qsp.....1Kg	487,5	502,5

Apêndice 27 - Componentes utilizados no preparo das rações:

- Caseína: Sigma C.7078, 85% (proteína)
- Concentrado Protéico de Soja Procom 2000 - Soya ® 67,7% (proteína)
- Fibra: Microcel ® (Blanver)
- Sacarose: Merck art: 7651
- Mistura Vitamínica: AIN-93 G (Roche)
- Mistura Mineral: AIN-93 G - formulada com sais de pureza analítica.
- Bitartarato de Colina: Sigma
- Óleo: Óleo de Soja Lisa ®
- Amido: Maisena ®

ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 20/2009

Interessado: MÁRCIO CARUSO

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Projeto: Estudo Comparativo entre Lactoferrina e Extrato dos Fatores Mitogênicos (MBWE) do Soro do Leite Bovino in vivo e in vitro sob os pontos de vista: clínico macroscópico; histológico; imunohistoquímico; e ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Parecer nº 58/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Estudo Comparativo entre Lactoferrina e Extrato dos Fatores Mitogênicos (MBWE) do Soro do Leite Bovino in vivo e in vitro sob os pontos de vista: clínico macroscópico; histológico; imunohistoquímico; e ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão", apresentado pelo pós-graduando Márcio Caruso, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em abril de 2010.

Araraquara, 03 de dezembro de 2009.

Profª. Drª. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO 2: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 01/2011
Interessado: MARCIO CARUSO
Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
Projeto: Estudo da lactoferrina no crescimento celular da parede intestinal e cicatrização cirúrgica, em ratos submetidos a diferentes fontes protéicas

Parecer nº 06/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Estudo da lactoferrina no crescimento celular da parede intestinal e cicatrização cirúrgica, em ratos submetidos a diferentes fontes protéicas", apresentado pelo doutorando Marcio Caruso, orientado pelo Professor Doutor Valdir Augusto Neves, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em setembro de 2011, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 10 de junho de 2011.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

missão de Ética no Uso de Animais
Seção Técnica Acadêmica – 16 3301 6897
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP
Rodovia Araraquara-Jaú km 01 CEP 14801-902 Araraquara SP

ANEXO 3: Confirmação de Recebimento do Artigo

checklist contact details manuscript details cover letter author details payment upload done

HISTOMORPHOMETRIC STUDY OF ROL... (Manuscript ID 1425462360650534)

Congratulations - you have successfully submitted your manuscript to *Nutrition & Metabolism*

You will shortly receive a confirmatory e-mail. At any time, you may log in to My Manuscripts to view the status of your manuscript in peer review. You may also submit revisions of your manuscript via My Manuscripts.

If you have any questions, please e-mail info@biomedcentral.com.

ARTIGO

HISTOMORPHOMETRIC STUDY OF ROLE OF LACTOFERRIN IN ATROPHY OF THE INTESTINAL MUCOSA OF RATS

CARUSO. M.[1]; DEMONTE, A.[2], NEVES. V. A.[2]*

[1]UNIARA – University Centre of Araraquara

[2]Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University -UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

Email:

CM: macaru@hotmail.com
AD: demontea@fcfar.unesp.br
VAN: nevesva@fcfar.unesp.br

*Corresponding author: [2]Department of Food and Nutrition; School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University-UNESP. Araraquara–Jaú Road, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Telephone: 055 (16) 3301-6935; FAX: 055 (16) 3301-6920. Email: nevesva@fcfar.unesp.br

Abstract

Background: The purpose of this work was to study the effects of oral administration of lactoferrin (Lf) in rats subjected to atrophy of the small intestine induced by a diet based on soy protein concentrate as the main protein source.

Methods: We used 24 male Wistar rats aged 40 days, kept in individual cages under appropriate conditions of temperature, light and humidity. The animals were divided into four groups (n = 6): 1) group SL received soy-based food and, once a day, a supplement of 200mg/kg of Lf administered by gavage; 2) group Si received the soy feed without supplement of Lf; 3) group CL received a diet based on casein plus Lf; 4) group Ci received the casein diet without supplement of Lf. At the end of fifteen days, a 10 mm segment of the initial portion of the small intestine was sectioned and subjected to morphometry of the intestinal crypts and villi and assessment of the number and size of myofibroblasts.

Results: Comparison between groups showed that the length of the villi was similar in groups Ci and CL (p>0.05) and higher in CL than in SL (p<0.001); SL than in Si (p<0.001), in Ci than in SL (p<0.001), and in Ci than in Si to Ci (p<0.001). The crypt depth was similar in SL and CL, SL and Ci and Ci and CL (p> 0.05) and was higher in Si than in Ci (p<0.001) and in Si than in SL (p<0.001). The number of myofibroblasts was higher in SL than in CL, in SL than in Si, in CL than in Ci, and in SL than in and Ci (all p<0.001); between Ci and Si there was no difference (p>0.05). The area of myofibroblasts was similar between the groups SL and CL and Si and Ci (p>0.05) and higher in SL than in Si, and in Cl than in and Ci (p<0.001), and in SL than in Ci (p<0.01). All statistical analysis assumed significance when p<0.05.

Conclusion: From these results, we conclude that lactoferrin increases the number and size of the pericrypt myofibroblasts and stimulates rapidly the regeneration of atrophied villi.

Keywords: soybean, casein, crypts, intestinal villi, lactoferrin, myofibroblast, regeneration, atrophy

Background

The basic functional unit of absorption in the intestine is the "crypt-villus". Enterocytes proliferate in the crypt and migrate toward the top of the villi where they are discarded at the end of their useful life. The reproduction rate of these cells in the crypt and the rate migration may be altered in various physiological or pathological states and also by the action of various substances [1]. Nutritional factors may be directly responsible for altering the intestinal mucosa [2]. The gut-nutrient relationship is extremely complex and involved, where even the mere presence or absence of nutrients in the intestinal lumen may induce changes or adaptations, such as atrophy or hypertrophy of the mucosa. There are reports that soybean meal can cause an increase in villous atrophy and some authors assume those immunologically active proteins, such as glycinin and β-conglycinin, are responsible for hypersensitivity reactions, and thus cause villous atrophy [3]. Feeding pigs on a diet with soybean meal as the sole source of protein, or on "corn/soy" diets for pigs, resulted in a lower villus height in the middle portion of the small intestine, as well as deeper in all areas of the small intestine [4], compared to diet with casein as the main protein observed by Caruso & Demonte [5] in rats subjected to dietary soy protein concentrate as the sole protein source.

Lactoferrin (Lf) is a glycoprotein belonging to the transferring group well recognized for its antimicrobial action and also for promoting cell growth and differentiation [6]. The molecular mechanisms by which lactoferrin acts at the cellular level are largely unknown, but specific receptors for lactoferrin have been described in various cell types and tissues of mammals, such as monocytes, lymphocytes, platelets, liver, epithelial cells of the mammary glands and intestines [7]. Some studies have shown the involvement of this protein in stimulating the growth of epithelial cells such as keratinocytes [8], enterocytes in Caco-2 culture [9], epithelium of the intestinal lymphoid tissue [10] and endometrial stromal cells [11]. Similar actions have also been demonstrated for cells of mesodermal origin, such as osteoblasts [12], lymphoblastic T cells [13] and also in angiogenesis [14]. Myofibroblasts (Mf), cells of mesodermal origin, which are differentiated fibroblasts that have been to express smooth muscle cell phenotype, are often located beneath the skin, as well as at the edge of the crypts and in the lamina propria of intestinal villi. They are the source of various cell growth factors, such as FGF (Fibroblast Growth Factor) and HGF (Hepatocyte Growth Factor), and also of basement membrane proteins [15].

Our experiment had the objective of determining the possible influence of oral administration of lactoferrin on the sub-epithelial pericrypt sheath myofibroblasts and the repopulation of the intestinal mucosa of rats, atrophied by the use of soy as the only source of protein.

Methods and procedures

Animals

A total of 24 male albino Wistar rats, aged 40 days, average weight of 123.8 ± 1.2 grams, were allowed to adapt for three days, with free access to commercial feed (Labina ®, Purina) and water under the following conditions: forced ventilation, controlled humidity and temperature (50-60% RH and 22℃ ± 1℃), and a 12:12 h light and dark cycle. After adaptation, the animals were first weighed and separated into four groups of six animals, identified and transferred to individual cages. The four groups (n = 6) received different types of feed, with or without supplements of lactoferrin and were identified with the following codes: Ci (casein alone), CL (casein plus lactoferrin), Si (soybean alone); and SL (soybean plus lactoferrin). The weighing was repeated on the fifth, tenth and fifteenth day of the experiment.

Diets

Diets were prepared in compliance with the American Institute of Nutrition (AIN-93) recommendations [16]. Each animal received 10g of their daily diet (AIN-93) and water *ad libitum*. All procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [17]. Groups CL and SL received 200 mg/kg lactoferrin (Bioferrin 1000®, Apolactoferrin, Glanbia Nutritionals) dissolved in 1.0 mL of distilled water (200mg/mL) by gavage, once daily. The dose and method of administration were based on other experiments [18,19,20,21].

Experimental Procedure

For fifteen days, group SL ate a feed with soya as the only protein source and received the lactoferrin by gavage once a day, while group Si received the soy diet without the lactoferrin. A third group (CL) received a diet with casein as only protein source and lactoferrin by gavage, while the last group (Ci) received the casein diet without lactoferrin.

Surgical Procedure

At the end of fifteen days the animals were anesthetized with ketamine (50mg/kg)/xylazine (5mg/kg). Each animal was subjected to trichotomy of the ventral region and antisepsis with 1% povidone-iodine solution. By laparotomy, a 10 mm long segment was sectioned from the initial portion of the small intestine, 4 cm from the xiphoid process, 15 mm from the gastro-duodenal junction and termino-terminal anastomosis was performed with the edges of the bowel, for its use in another experiment. The sectioned segments of intestines were examined by conventional histological techniques for histomorphometry of the villi and intestinal crypts and immunohistochemistry to assess of the number and size of the myofibroblasts. The experimental procedure was approved by the Ethics Committee for Animal Use in Research (CEUA), Faculty of Pharmaceutical Sciences UNESP (res. 06/2011).

Treatment of Collected Material

After being fixed in 10% formaldehyde (in pH 7.5 buffer), the segments were subjected to the standard technique of dehydration in increasing battery of ethyl alcohol, xylene and embedded in paraffin wax. Thin sections (4 µm thick) were cut in the conventional microtome, and laid on both untreated and silanized microscope slides. For the observation and measurement of intestinal villi and crypts, slide was stained with hematoxylin and eosin (HE). The avidin-biotin peroxidase (ABP) immunohistochemical technique devised by Hsu et al. [22] was used to reveal myofibroblasts. This indicates, in brown tones, the presence of these cells. The silanized slides were used for good adhesion of the histological sections. After dewaxing and rehydration of the sections, the slides were immersed in citrate buffer (pH 6.0) exposed to microwave oven for 15 minutes, then transferred to phosphate buffer with hydrogen peroxide + 3% methanol for 20 minutes, to block endogenous peroxidase. Slides were incubated in primary antibody anti-α-smooth muscle actin (Monoclonal Mouse Smooth Muscle Actin Clone 1A4 Code M0851, Dako Cytomation, USA) for 12 hours at 4 ℃. After washin g in phosphate buffer, biotinylated antibody was applied to the slides for 30 minutes at room temperature. After another bath in phosphate buffer, we applied the complex streptavidin/ peroxidase for 30 minutes, at room temperature. The slides were again washed in phosphate buffer, treated with diaminobenzene to reveal the immune reaction and counterstaining with hematoxylin.

Analysis of Slides

Observations and measurements were taken with an Olympus BX 50 optical microscope (Olympus America Inc., USA), at magnifications 100X and 400X, in three different fields. The images were captured by a Sony SSC-DC54 digital camera (Sony Electronics Inc) and sent to a Pentium IV computer equipped with an E1940 LG Flatron monitor (LG Electronics, USA). All measurements were performed with the program ImageJ 1.44p (Natl. Inst. of Health, USA). The length of the villus (LV) was measured from its basal region, which coincides with the top of the crypts. A line was drawn between two points on the base and another line perpendicular to it, toward the point at the apex of the villus. The length of the second line, in µm, provided by the image analyzer, was taken as the length of the villus (Figure 1). The depth of the crypt (DC) was measured from its base to the crypt-villus transition These structures were measured on both sides (right and left) of the cut, to reduce, by averaging, any changes in measurement due to a possible tilt of the material during embedding of the segment in wax. For each animal, 160 villi and 80 crypts were measured giving a total of 960 villi and 480 crypts for each diet group. The number of myofibroblasts was determined by direct counting. Areas of myofibroblasts were extracted by ImageJ 1.44p, from the images by individually marking them by means of the Freehand Select tool, as shown in Figure 2.

Statistical Analysis

Two-way Analysis of Variance (ANOVA) for repeated measures was used, with a significance level (alpha) $p \leq 0.05$, to compare the values obtained in the measurement of all villi and crypts on both sides of the section, instead of simply taking the value. The weights of animals in different groups were compared with the Student t-test, also at a significance level (alpha) $p \leq 0.05$. Linear Regression and Correlation analysis were used to compare the values obtained for the variables studied. The software used was PAST 1.99, Excel (Microsoft Co) and BioEstat 5.0.

Results

Animal weight (g): the Student t-test showed that the means on the first day were similar in all groups ($p>0.05$). On the fifth day, there was a very significant difference between groups Ci and Si favoring the casein group ($p<0.001$). Between groups CL and SL, the weight of casein group was again higher

(p=0.001). Comparing groups SL and Si showed a significantly higher weight for the lactoferrin group (p<0.05). Between groups Ci and SL, the comparison was favorable to the casein group (p=0.001). There was no significant difference between the groups CL and Ci. On the tenth day, comparisons between groups CL and SL, Ci and SL and CL and Ci showed no significant difference. Between groups Ci and Si the casein group showed more growth (p<0.001). The groups SL and Si showed a highly significant difference, favorable to the Lactoferrin group (p<0.001). On the fifteenth day, there was a very significant difference between the groups Ci and Si, the casein group having grown more (p<0.001), while groups SL and Si showed a highly significant difference favor of the Lactoferrin group (p<0.001). No differences were observed between groups Ci and CL; CL and SL or Ci and SL The average weights of the groups are compared in Table 1.

Length (height) of villi (LV)

The comparisons between groups are shown in Table 2. Comparisons between the groups Ci and Si, between CL and SL and between Ci and SL all showed that the length of the villi was significantly higher in animals fed casein than in those fed soybean (p<0.001). In the comparison between groups Si and SL, LV was significantly higher in animals that received Lactoferrin supplementation (p<0.001). There was no significant difference in LV between the groups Ci and CL.

Depth of crypts (DC)

Table 3 compares the increased depths of the crypts (DC), in micrometers (µm), between pairs of groups. The comparison between Ci and Si indicates that the depths of the crypts are significantly different between the two protein sources, being greater for animals fed soy. In the comparison between the groups SL and Si, DC was significantly higher in animals without Lactoferrin supplementation (p<0.001). The comparisons between the groups CL and SL; CL and Ci and Ci and SL showed no significant difference.

Number of myofibroblasts (NMF)

In Table 4, the comparison between groups Ci and Si shows no significant differences, indicating that the type of dietary protein does not interfere in the number of myofibroblasts. In the table, comparing the groups SL and Si, CL and Ci and Ci and SL, a value of p<0.001 is observed, a highly significant difference

indicating that supplementing the soy or casein diet with Lactoferrin increase the number of myofibroblasts.

Area of myofibroblasts (AMF)

Comparisons of the areas of myofibroblasts between the groups are shown in Table 5. Highly significant values ($p<0.001$) were obtained for the comparisons between groups SL and Si and CL and Ci, while Ci and SL also differed ($p<0.01$). Between the groups SL and CL and between Si and Ci comparisons showed no significant differences. Thus, AMF was not affected by the dietary protein, but the lactoferrin supplement increased the total myofibroblast area significantly.

Discussion

A large number of studies of the role of lactoferrin in the intestinal mucosa have been related to the participation of this protein in the control of microorganisms, mainly related to the ability to transport iron and other metals [6,23,24]. Our experiment with its greater emphasis on cell proliferation assessed the role of lactoferrin with regard to the regeneration of intestinal villi undergoing atrophy. Hagiwara et al. [25] carried out experiments on cultured rat intestine cells and showed that bovine lactoferrin, associated with EGF (Epidermal Growth Factor), actively stimulates the proliferation of enterocytes.

Weight of animals: on the fifth day, the difference between the groups Ci and Si can be explained by villous atrophy caused by the allergenicity of proteins and/or antinutritional factors in soy, which occurs within the first 24 hours after ingestion [26] and the consequent malabsorption of nutrients. The same is valid for the comparison between groups CL and SL groups, although the difference between the average weights is less significant, which can be explained by a study of Conneely [27] that describes the anti-allergenic activity of Lactoferrin as manifesting itself in a few hours. Also, Lactoferrin may have shown some activity in villus repopulation. The difference between the groups SL and Si ($p<0.05$) in favor of Lactoferrin, in this period indicates that this protein, in some ways, has a beneficial effect, improving the absorption of nutrients. The comparison between groups CL and Ci showed no significant difference, although the average weight is approximately 1.2% higher for the CL group. This can probably be explained by the fact that there are mechanisms that maintain homeostasis of the intestinal mucosa,

preventing the hypoplasia or the opposite, the hyperplasia of the villi, both situations that can alter the degree of intestinal absorption [28].The intrinsic mechanisms that regulate cell proliferation in the small intestine are not well understood. Studies on the replication of intestinal epithelial cells *in vivo* have suggested that the size of the villi regulates cell proliferation in the crypt, through a negative feedback control. May et al. [28], in an *in vitro* experiment with theIC-6 cell line from the small intestine of rats, partially purified, a factor that inhibited DNA synthesis and the growth of these cells, was not cytotoxic and appeared to be specific for the intestinal epithelium. However, in an experiment using cultures of various strains of intestinal cells, Goke, Kana, Podolsky [29] demonstrated that differentiated fibroblasts (myofibroblasts) often present in these culture models, regulate cell proliferation by paracrine action. More recently, Neunlist et al. [30], also in an *in vitro* experiment have shown that neuronal and glial components of the enteric nervous system, particularly the glial cells, could act together with other components of the mucosa, such as myofibroblasts, to enhance the control over cell proliferation in the intestinal epithelium and contribute to the maintenance of homeostasis.

Histomorphometry of the intestinal mucosa: the dimensions of the villi and crypts depict clearly the physiological or pathological conditions to which the digestive system is being subjected at a given time. As previously reported, there are numerous situations that can cause changes in the mucosa [2,5,31,32]. Various substances in different experiments have been shown to stimulate the increase in villus height and decrease in crypt depth decreased. King et al. [33] showed these effects using bovine colostrum in the diet of early weaned piglets. This result was expected, since colostrum is rich in cell growth factors, so that the whey is often used as a means of cell cultures. However, Lee et al. [34] showed that supplementation with combined swine epidermal growth factor (EGF) and glutamine had no effect on intestinal development in early-weaned piglets. Read-Snyder et al. [35] also obtained similar result by adding selenium to the diet of chickens infected with reovirus. Another study by Garcia et al. [36], in which formic acid was associated with plant extracts showed similar results. Asfar [37] showed that villous atrophy of the mucosa of rats, induced by fasting, was reversed to normal by the intake of green tea and also, to a lesser extent, by vitamin E. However, black tea did not show this effect.

In our experiment, the comparison between groups of animals fed on casein or soybean as the main protein source, supplemented with Lactoferrin, shows exactly the behavior and response that the small intestine is capable of when subjected to different nutritional conditions. As expected, following an earlier study [5], comparison of the height of villi and depth of crypts, in the intestinal mucosa revealed highly significant differences between the groups without lactoferrin supplementation fed on casein (Ci) and soybeans (Si), corroborating reports in the literature, that soybeans, in the first instance, cause villous atrophy [26]. The opposite occurs in the depth of crypts, which show hyperplasia toward the submucosa in order to repopulate, by consecutive mitosis, their respective villi. Our experiment showed a highly significant difference between groups Si and Ci ($p < 0.001$). These two results show that, even after 15 days, the mucosa had no recovered, exhibiting a nutritional deficit that was reflected in the low weight of the animals in group Si relative to group Ci, ($p<0.001$). The length (height) of the villi in the SL and CL groups showed a highly significant difference, with longer villi in the CL group ($p<0.001$). Even so, the mean height of the villi of the SL rats was much larger than that group Si ($p<0.001$), showing that this supplement had some ability to stimulate the proliferation of enterocytes, affecting positively the weight of the animals supplemented with Lactoferrin ($p<0.001$). This result also shows that the activity of Lactoferrin *in vivo* may be similar to that demonstrated by Oguchi et al. [9] *in vitro*. Similar results were obtained by Wang et al. [38] in his study of pigs supplemented with 1g/kg Lactoferrin. Although, the villi in group CL are only slightly longer than villi of group Ci, without statistical significance, this result proves more consistent with the findings from the literature, which clearly demonstrates that there are highly effective mechanisms for maintaining the homeostasis of the intestinal epithelium [28,29,30]. The same is valid, therefore, when comparing the depth of the crypts in these two groups and also, in groups CL and SL, which showed no difference in crypt depth, even though the villus height was significantly higher in group CL. This leads us to believe that, at a given length of the villi, there is a partial inhibitory action on mitosis in the crypts, by control mechanisms mentioned above.

Myofibroblasts of the intestinal pericrypt sheath: myofibroblasts play a crucial role in the healing process and regeneration of the skin and there are numerous studies that seek to demonstrate the role of

these cells in the gastrointestinal tract. Some show their beneficial features [39,40,41,42,43] and others cite harmful activities [44,45,46]).

Subepithelial myofibroblasts, in a sheath around of the intestinal crypts, called "peri-crypt myofibroblasts" have been in to be responsible for the proliferation of villus enterocytes, secreting factors that stimulate mitosis in the crypts [43,47]. These cells are also considered important in the mechanism coordinating the crypt-villus unit. It is believed that the pericrypt myofibroblasts, which form a sheet underlying the intestinal epithelium, may modulate intestinal epithelial cell proliferation and differentiation, increase the resistance of lumen-blood barrier and modulate epithelial secretory responses to various agonists, such as acetylcholine or prostaglandins [30]. Shao & Sheng [43], in an experiment with mice, have demonstrated the important role of subepithelial myofibroblasts in regulating the composition of the microenvironment for regeneration of the intestinal epithelium, showing that on receiving extracellular stimuli, these cells produce a variety of epidermal growth factors, including amphiregulin (Areg), which stimulate the growth of intestinal epithelium through a paracrine pathway. Growth factors secreted by myofibroblasts have three actions: starting or increasing cell motility, inducing proliferation and inducing terminal differentiation of cells, even leading to apoptosis. These factors may act on the myofibroblasts themselves, in an autocrine manner, or in a paracrine manner on epithelial or parenchymal cells, in tissue repair [48].

Tsai et al. [49], in an experiment with mice, found that glucagon-like peptide 2 (GLP-2), a hormone produced by endocrine cells in the gastrointestinal tract, stimulates intestinal growth, increasing the proliferation of crypt enterocytes. Also working with mice, Orskov et al. [39] concluded that GLP-2 acts by binding to a receptor on intestinal myofibroblasts. These cells secrete various growth factors, one of which is KGF, which may be responsible for the growth of the villi of the colon and in particular the proliferation of goblet cells.

In our experiment, we observed that Lactoferrin stimulated a significant increase in the number and size of myofibroblasts. The comparison between groups Si and Ci showed that the type of diet protein did not influence the number and size of myofibroblasts ($p>0.05$), thus, neither the antigenicity of soy protein nor antinutritional factors influenced the mechanisms of proliferation and / or stimulation of myofibroblasts.

This means that the role of myofibroblasts in promoting apoptosis of enterocytes [48], is very subtle and that villous atrophy is due more to the discard of the cells in the intestinal lumen.

Despite a significant increase in the number of myofibroblasts in group CL relative to group Ci (p<0.001) showing the effect of Lactoferrin, the comparison between CL and SL showed that NMF was significantly higher for the soy group, so that there must be some synergistic effect between lactoferrin and another factor, when the mucosa is atrophied and consequently there is a need for more intense stimulation of enterocytes proliferation. Various cytokines and growth factors are cited by Powell et al. [48] as activators or stimulating the proliferation of myofibroblasts. One of these factors is referred to as EGF (Epidermal Growth Factor). Hagiwara et al. [25] showed a synergy between lactoferrin and EGF in cell proliferation, in a culture of rat intestinal cells.

Comparing the groups SL and Si, we found highly significant values for the activity of Lactoferrin, increasing both for the number and size of myofibroblasts, indicating that this protein has a really strong effect on these cells, which was also reflected in the proliferation of villous enterocytes. This result is consistent with findings for other proteins, such as TSH [50], myostatin [51]; endothelin [41] and leptin [52].

Conclusions

Lactoferrin, administered orally at a dose of 200 mg / kg / day to rats subjected to atrophy of the intestinal mucosa, increases the number and size of the pericrypt myofibroblasts and rapidly stimulates rapidly the regeneration of atrophied villi. Therefore, supplementation with this protein may be valuable for individuals suffering atrophy of the mucosa by antimitotic substances or sudden changes in diet.

List of abbreviations used

Ci (casein alone), CL (casein plus lactoferrin), Si (soybean alone); and SL (soybean plus lactoferrin), FGF (Fibroblast Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), Myofibroblasts (Mf), Lactoferrin (Lf), Depths of the Crypts (DC), Number of myofibroblasts (NMF), Area of myofibroblasts (AMF), EGF (Epidermal Growth Factor)

Acknowledgments

The authors acknowledge the careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts (MSc).

Author's contribution

VAN and **MC** designed the research; **MC** conducted the research; **MC** analyzed the data; **VAN** and **MC** wrote the paper; and **MC** had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

M. Caruso, A. Demonte and V.A. Neves declare that they have no competing of interests.

Author details

Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University -UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

References

1. Thomson ABR, Keelan M: **The Development of the Small Intestine**. *Can J Physiol Pharmacol* 1986, **64**:13-29.

2. Thomson ABR, Keelan M, Wild GE: **Nutrients and intestinal adaptation**. *Clin Invest Med* 1996, **19**:331-45.

3. Li DF, Nelssen JL, Reddy PG: **Transient hipersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig**. *J Anim Sci* 1990, **68**:1790-99.

4. Allee Gl, Touchette, KJ: **Efectos de la Nutricion Sobre la Salud Intestinal y el Crescimiento de Lechones**. *Adv Nutr Aliment Anim* FEDNA 1999; **125**: 144.

5. Caruso M, Demonte A: **Histomorfometria do Intestino Delgado de Ratos Submetidos a Diferentes Fontes Protéicas**. *Alim Nutr***, 2005: 16**, 131-136.

6. Vorland L H **Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein**. *APMIS* 1999, **107**:971-981.

7. Suzuki YA, Lonnerdal B: **Characterization of mammalian receptors for lactoferrin.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:75-80.

8. Chen J, Wu JJ, Li J: **Lactoferrin promotes human skin keratinocyte proliferation**. *19th Ann Symp Adv Wound Care*, 2006.

9. Oguchi S, Walker WA, Sanderson IR: **Iron saturation alters the effect of Lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells).** *Biol Neonate* 1995, **67**:p.330-339.

10. Schottstedt T, Muri C, More LC, Philipona C, Hammon HM, Blum JW: **Effects of Feeding Vitamin A and Lactoferrin on Epithelium of Lymphoid Tissues of Intestine of Neonatal Calves**. *J Dairy Sci* 2005, **88:**1050–1061.

11. Yanaihara A, Toma Y, Saito H, Yanaihara T: **Cell proliferation effect of lacoferrin in human endometrial stroma cells**. *Molecul Human Reproduc* 2000, 6:469-473.

12. Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Jian-Ming Lin J-M, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW, Grey AB, Ian R, Reid IR: **Lactoferrin Is a Potent Regulator of Bone Cell Activity and Increases Bone Formation *in vivo***. *Endocrinology* 2004; **145**, 4366–4374.

13. Esaguy N, Freire O, VAN Embden JD, aguas AP: **Lactoferrin triggers in vitro proliferation of T cells of Lewis rats submitted to mycobacteria-induced adjuvant arthritis**. *Scand J Immunol* 1993; **38**:147-152.

14. Norrby K: **Human Apo-Lactoferrin Enhances Angiogenesis Mediated by Vascular Endothelial Growth Factor A *in vivo***. *J Vasc Res* **2004,** 41:293–304.

15. Fritsch C, Swietlicki EA, Lefebvre O, Kedinger M, Iordanov H, Levin MS, Rubin DC: **Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis**. *J Clin Invest* 2002; **110**:1629-1641.

16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nutr* 1993, **123**:1939-1951.

17. National Research CounciL **Guide for care and use of laboratory animals**. **Publication 85-23** Revised ed. Washington, DC: *Natl Acad Sci*, 1985.

18. Togawa J-I, Nagase H, Tanaka K, Namori M, Umezawa T, Nakajima A, Naito M, Sato S, Saito T, Sekihara H: **Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance**. *J Gastr Hepatol* 2002, **17**:1291-1298.

19. Wakabayash H, Kurokawa M, Shin K, Teraguchi S, Tamura Y, Shiraki K: **Oral lactoferrin prevents body weight loss and increases cytokine responses during herpes simplex virus type 1 infection of mice***. Biosci Biotechnol Biochem* 2004**, 68**:537–544.

20. Varadhachary A **Oral Lactoferrin Inhibits Growth of Established Tumors and Potentiates Conventional Chemotherapy**. *Intl J Cancer* 2004, **111:**398-403.

21. Shin K, Wakabayashi H, Koji Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, Kurokawa M, Shiraki K: **Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice**. *J Med Microbiol* 2005, 54:717–723.

22. Hsu SM, Raine L, Fanger H: **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and untabeled (PAD) procedure**. *J Histochem Cytochem* 1981, **29**:557-580.

23. Sanchez L, Miguel Calvo M, Brock JH: **Biological role of lactoferrin**. *Arch Dis Child* 1992, **67**:657-661.

24. Stevanato MB: **Estudo da eficiência da Lactoferrina como conservante em formulações semi-sólidas para produtos cosméticos e farmacêuticos**. 2005, 145p. *Tese (Doutorado em Ciências*

Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto.

25. Hagiwara T; Shinoda I, Fukuwatar Y; Shimamura S: **Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor**. *Biosc biotechnol biochem* **1995**; 59:1875-1881.

26. Kilshaw PJ, Slade H: **Villus atrophy and crypt elongation in the small intestine of preruminant calves fed with heated soyabean flour or wheat glúten**. *Res Vet Sci* 1982, **33**:305-308.

27. Conneely, OM: **Antiinflammatory Activities of Lactoferrin**. *J Amer Coll Nut***,** 2001; **20**: 389S–395S.

28. May RJ, Quaroni A, Kirsch K, Isselbacher KJ: **A villous cell-derived inhibitor of intestinal cell proliferation***. Am J Physiol* 1981, **24**:G520-G527.

29. Göke M, Kanai M, Podolsky DK: **Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor.** *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 1998; **274**:G809-G818*.*

30. Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP: **Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-b1 dependent pathway**. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2007, 292:G231-G241.

31. Wells CL, Rhame FS: **Effect of oral dextran sulfate on the mouse intestinal tract***. J Acquir Immune Defic Syndr* 1990, **3**:361-365.

32. Wells CL, Maddaus MA, Reynolds CM, Jechorek RP, Simmons RL: **Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultatively anaerobic intestinal bacteria**. *Infect Immun.* **1987**, 55:2689-2694.

33. King MR, Morel PCH, Revell DK, Pluske JR, Birtles MJ: **Dietary bovine colostrum increases villus height and decreases small intestine weight in early-weaned pigs.** *Asian-Austral J Anim Sci* 2008, **21**:567-57.

34. Lee DN, Chang WF, Yu IT, Chiou PWS, Weng CF: **Effects of diets supplemented with recombinant epidermal growth factor and glutamine on gastrointestinal tract development of early-weaned piglets**. *Asian-Australasian J Anim Sci* 2008**, 21**:582-589.

35. Read-Snyder J, Edens FW, Cantor AH, Pescatore AJ, Pierce JL: **Effect of Dietary Selenium on Small Intestine Villus Integrity in Reovirus-Challenged Broilers**. *Intern J Poultry Science* 2009, **8**:829-835.

36. García V, Catalá-Gregori P, Hernández F, Megías MD, Madrid J: **Effect of Formic Acid and Plant Extracts on Growth, Nutrient Digestibility, Intestine Mucosa Morphology, and Meat Yield of Broilers**. *J Appl Poultry Res* 2007; **16**:555-562.

37. Asfar S, Abdeen S, Dashti H, Khoursheed M, Hilal-Al-Sayer H, Mathew M: **Effect of Green Tea in the Prevention and Reversal of Fasting-Induced Intestinal Mucosal Damage**. *Nutrition* 2003**; 19**:536-540.

38. Wang Y, Shan T, Xu Z, Liu J, Feng J: **Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets**. *J Anim Sci* 2006, **84**:2636-2641.

39. Ørskov C, Hartmann B, Poulsen SS, Thulesen J, Hare KJ, Holst JJ: **GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors.** *Regul Pept* 2005, **124**:105-112.

40. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC: **Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer**. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2005, **289**:G2-G7.

41. Nishida T, Tsuji S, Kimura A, Tsujii M, Ishii S, Yoshio T, Shinzaki SI, Egawa S, Irie T, Yasumaru M, Iijima H, Murata H, Kawano S, Hayashi N: **Endothelin-1, an ulcer inducer, promotes gastric ulcer healing via mobilizing gastric myofibroblasts and stimulates production of stroma-derived factors.** *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* **2006**, 290:G1041–G1050.

42. Saada JI, Pinchuk IV, Barrera CA, Adegboyega PA, Suarez G, Mifflin RC, Di Mari JF, Victor E, Reyes VE, Don W, Powell DW: **Subepithelial Myofibroblasts are Novel Nonprofessional APCs in the Human Colonic Mucosa**. *J Immunol* **2006,** 177:5968-5979.

43. Shao J, Sheng H: **Amphiregulin Promotes Intestinal Epithelial Regeneration: Roles of Intestinal Subepithelial Myofibroblasts**. *Endocrin J* 2010,**151**:3728–3737.

44. Jobson TM, Billington CB, Hall IP: **Regulation of Proliferation of Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts by Mediators Important in Intestinal Inflammation.** *J Clin Invest* 1998, **101**: 2650–2657.

45. Illemann M, Hansen U, Nielsen HJ, Andreasen PA, Høyer-Hansen G, Lund LR, Danø K, Boye Schnack Nielsen BS**: Leading-Edge Myofibroblasts in Human Colon Câncer Express Plasminogen Activator Inhibitor-1**. *Am J Clin Pathol* 2004, **122**:256-265.

46. Shao J **Roles of Myofibroblasts in Prostaglandin E2–Stimulated Intestinal Epithelial Proliferation and Angiogenesis.** *Cancer Res* 2006**,** 66:846-855.

47. Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Goldman J, Alison MR, Wright NA**: Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon**, *Gut J Gastr Hepat* 2002; **50**: 752-757.

48. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB: **Myofibroblasts: Paracrine cells important in health and disease.** *Am J Physiol Cell Physiol* 1999, **277**:C1-C19.

49. Tsai CH, Hill M, Asa Sl, Brubaker Pl, Drucker DJ: **Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide- in mice.** *Am J Physiol* 1997, **273**:E77–E84.

50. Drobnik J, Ciosek J, Slotwinska D, Stempniak B, Zukowska D, Marczynski A, Tosik D, Bartel H, Dabrowski R, Szczepanowska A: **Experimental hypothyroidism increases content of collagen and glycosaminoglycans in the heart**. *J Physiol Pharmacol* 2009; **60:**57-62.

51. Cantini LP, Ferrini MG, Vernet D, Magee TR, Qian A, Gelfand RA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF: **Profibrotic Role of Myostatin in Peyronie's Disease**. *J Sex Med*.2008; **5**: 1607–1622.

52. Nakamura M, Akiba Y, Matsui H, Tsuchimoto K, Ishii H: **Interaction of leptin with gastric myofibroblast transdifferentiation in Hp-infected Mongolian gerbils: effect of rebamipide.** *Aliment Pharmacol Ther* 2003**,** 18:99–105.

Table 1. Intergroup comparisons of mean body weight (g).

Group	*PA5*	*p*	*PA10*	*p*	*PA15*	*p*
SL	128.15 ± 1.01	**0.001**	142.84 ± 1.15	0.134	154.89 ± 1.24	**> 0.05**
CL	133.22 ± 1.30		145.38 ± 1.42		155.42 ± 1.52	
Si	125.83 ± 1.05	**0.0001**	134.38 ± 0,91	5.43E-06	140.11 ± 1.17	**< 0.001**
Ci	131.75 ± 0.65		144.96 ± 0,72		155.01 ± 0.77	
SL	128.15 ± 1.01	**0.01**	142.84 ± 1.15	2.65E-06	154.89 ± 1.24	**< 0.001**
Si	125.83 ± 1.05		134.38 ± 0.91		140.11 ± 1.17	
CL	133.22 ± 1.30	**0.110**	145.38 ± 1.42	0.634	155.42 ± 1.52	**> 0.05**
Ci	131.75 ± 0.65		144.96 ± 0.72		155.01 ± 0.77	
Ci	131.75 ± 0.65	**0.001**	144.96 ± 0.72	0.119	155.01 ± 0.77	**> 0.05**
SL	128.15 ± 1.01		142.84 ± 1.15		154.89 ± 1.24	

PA5, PA10 and PA15 = mean animal weights in grams, on the 5th, 10th and 15th days respectively.
p = value of probability.

Table 2. Intergroup comparisons of mean villus length (LV) in µm.

Groups	MCV ± SD	*p*
SL	205.75 ± 32.5	***< 0.001***
CL	236.3 ± 33.2	
Si	154.9 ± 31.7	***< 0.001***
Ci	235.0 ± 32.5	
SL	205.5 ± 32.5	***< 0.001***
Si	154.9 ± 31.7	
Ci	235.0 ± 32.5	***< 0.001***
SL	205.5 ± 32.5	
CL	236.3 ± 33.2	***> 0.05***
Ci	235.0 ± 32.5	

MLV± SD = mean villusi length (LV) ± standard deviation of the animal group.
p = value of probability.

Table 3. Intergroup comparisons of mean crypt depth (PD) in µm

Groups	MPC ± SD	*p*
SL	52.83 ± 11.98	***> 0.05***
CL	48.73 ± 11.80	
Si	116.94 ± 37.57	***< 0.001***
Ci	50.34 ± 11.98	
SL	52.83 ± 11.98	***< 0,001***
Si	116.94 ± 37.57	
CL	48.73 ± 11.80	**> 0.05**
Ci	50.34 ± 11.98	
Ci	50.34 ± 11.98	**> 0.05**
SL	52.83 ± 11.98	

MDC ± SD = mean of the crypt depth (DC) ± standard deviation of the animal group.
p = value of probability.

Table 4. Intergroup comparisons of mean numbers of myofibroblasts (NMf)

Groups	MNMf ± SD	*p*
SL	6.31 ± 1.57	***< 0.001***
CL	5.52 ± 1.48	
Si	4.26 ± 1.30	*> 0.05*
Ci	4.38 ± 1.54	
SL	6.31 ± 1.57	***< 0.001***
Si	4.26 ± 1.30	
CL	5.52 ± 1.48	***< 0.001***
Ci	4.38 ± 1.54	
Ci	4.38 ± 1.54	***< 0.001***
SL	6.31 ± 1.57	

MNMf ± SD = mean number of myofibroblasts (NMf) ± standard deviation of the animal group.
p = value of probability.

Table 5 – Intergroup comparisons of mean total areas of the myofibroblasts (AMf) in µm^2

Groups	MAMf ± SD	*p*
SL	161.99 ± 6.99	***> 0.05***
CL	164.13 ± 6.47	
Si	153.24 ± 5.66	***> 0.05***
Ci	152.85 ± 4.43	
SL	161.99 ± 6.99	***< 0.001***
Si	153.24 ± 5.66	
CL	164.13 ± 6.47	***< 0.001***
Ci	152.85 ± 4.43	
Ci	152.85 ± 4.43	***< 0.01***
SL	161.99 ± 6.99	

MAMf ± SD = mean total area of the myofibroblasts (AMf) ± standard deviation of the animal group.
p = value of probability.

Legend of the figures

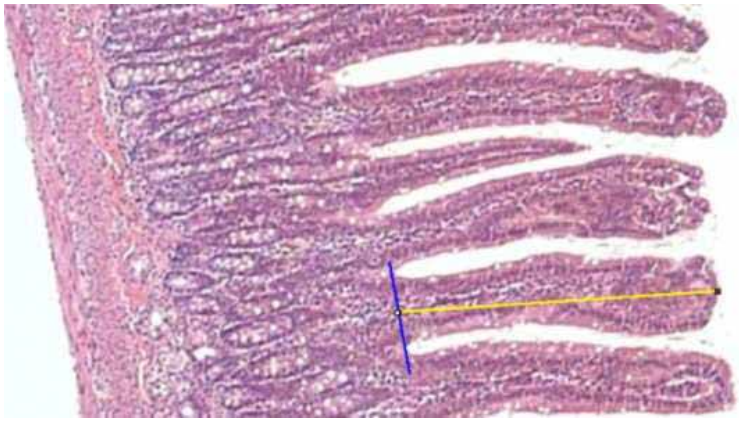

Figure 1. Measurement of the length of a villus with the Straight Line tool of Image J.]

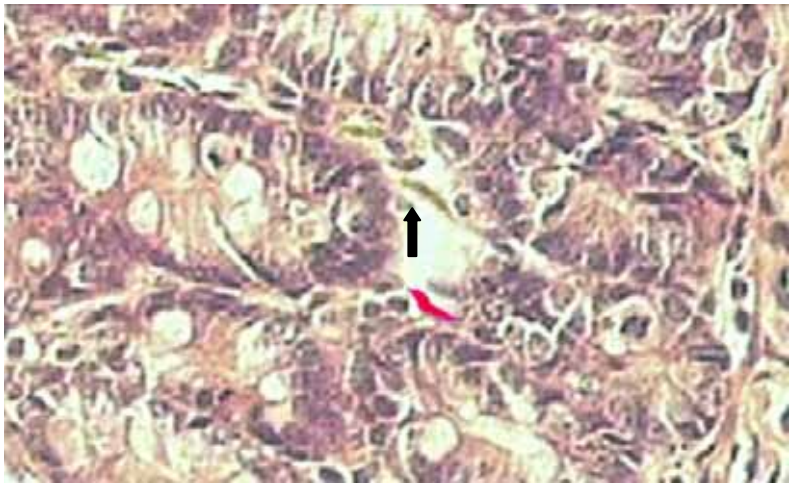

Figure 2. Determination of the total area of the myofibroblast pericrypt sheath, with the Freehand Selections tool, in ImageJ. Marked myofibroblast (red) and unmarked myofibroblasts (black arrow)