



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**EFEITO DA EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA NO PROCESSO DA  
CICATRIZAÇÃO – ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO EM RATOS**

**Chang Yung Chia**

**Rio de Janeiro**

**2016**

# **EFEITO DA EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA NO PROCESSO DA CICATRIZAÇÃO – ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO EM RATOS**

Chang Yung Chia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cirúrgicas em Medicina.

Orientadores:

Professora Doutora Christina  
Maeda Takiya

Professor Doutor José Eduardo  
Ferreira Manso

Professor Doutor César Silveira  
Cláudio-da-Silva

Rio de Janeiro

2016

# **EFEITO DA EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA NO PROCESSO DA CICATRIZAÇÃO – ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO EM RATOS**

Chang Yung Chia

Orientadores: Professora Doutora Christina Maeda Takiya

Professor Doutor José Eduardo Ferreira Manso

Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cirúrgicas em Medicina.

Aprovada por

---

Presidente, Professora Doutora Christina Maeda Takiya

---

Professora Doutora Vera Lúcia Panaim

---

Professor Doutor Wagner Baetas da Cruz

Rio de Janeiro

2016

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pelo incentivo e apoio incondicional.

À Professora Christina Maeda Takiya, pelos ensinamentos em patologia, e no rigor da metodologia científica.

Aos Professores José Eduardo Ferreira Manso e César Silveira Cláudio-da-Silva, pelo apoio e orientação.

Ao Professor Alberto Schanaider, pela disciplina, apoio e orientação.

Ao Professor Paulo César Silva e João Machado, pelo apoio, incentivo e orientação.

Ao professor Radovan Borojevic, pelos ensinamentos, incentivo e apoio.

Ao programa de Pós-Graduação, que ampliou o meu horizonte.

## **RESUMO**

### **EFEITO DA EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA NO PROCESSO DA CICATRIZAÇÃO – ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO EM RATOS**

Chang Yung Chia

Orientadores: Professora Doutora Christina Maeda Takiya

Professor Doutor José Eduardo Ferreira Manso

Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cirúrgicas em Medicina.

A resposta inflamatória decorrente do trauma é inevitável, as suas consequências podem ser devastadoras, e constituem um dos maiores problemas médico, econômico, e social na atualidade. Ao longo da evolução, a capacidade de “curar” a ferida pelo processo da regeneração parece que foi inibida nos mamíferos pelo desenvolvimento do sistema imunológico, que bloqueia a retomada da programação embrionária, fenômeno visto em animais mais inferiores na escala zoológica, e durante o desenvolvimento fetal nos humanos. A regeneração é o reestabelecimento da forma e função do tecido ou órgão danificado. Compreender e controlar o processo da regeneração pode solucionar inúmeros problemas da saúde. Grandes esforços são feitos nesta direção, e tem como o modelo de estudo o processo da cicatrização fetal. Sabe-se hoje que o feto humano cura a ferida sem a formação da cicatriz até o sexto mês intra-uterino, e esse processo é órgão dependente e célula específico, não influenciado pelo ambiente. Uma das maiores diferenças entre a cicatrização fetal e a de adulto ou pós-natal, e talvez um fator

controlável, é a inflamação. O processo da inflamação e o sistema imunológico são o alvo principal de estudos, na tentativa de atenuar o processo da cicatrização e consequente fibrose, que afeta todos os órgãos. Os resultados das pesquisas laboratoriais são promissores, entretanto, ainda não se encontram com eficácia suficiente para o uso clínico. Até o presente momento, não há substâncias de uso comercial que interfira diretamente no processo de cicatrização, ou seja, não existe nenhum produto “cicatrizante”. A andiroba é uma planta nativa da Amazônia brasileira com propriedades anti-inflamatórias e eutróficas. Estudos prévios realizados por diversos pesquisadores têm mostrado seu efeito benéfico sobre a inflamação, melhora a cicatrização da ferida com aumento do teor de colágeno, da força tensil e a re-epitelização. Este trabalho se propôs a estudar o efeito da emulsão comercial contendo óleo de andiroba, na lesão cutânea excisional, de espessura total em ratos. O estudo histológico e imunohistoquímico foi realizado nos dias 3, 7, 15 e 20 após a indução das feridas, e a resistência do tecido cicatricial foi testada no 20º dia. A inflamação foi avaliada através da quantificação de mastócitos, macrófagos e do processo de reparação da ferida pela quantificação de miofibroblastos, capilares neoformados, e do fator de crescimento transformador  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ). O grupo tratamento apresentou menor número de macrófagos e de miofibroblastos, e maior quantidade de vasos neoformados e de TGF $\beta 3$ , estatisticamente significantes. Os animais tratados também apresentaram tecido cicatricial menor, e com resistência a tração 30% superior ao grupo controle no dia 20. Conclui-se que o tratamento com a emulsão contendo óleo de andiroba testado modulou o processo de reparação da ferida com consequente melhor funcionalidade do tecido cicatricial.

Palavra-chave: Inflamação; cicatrização; regeneração; andiroba; *Carapa guianensis*.

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF EMULSION CONTAINING ANDIROBA OIL IN WOUND HEALING – IMMUNE-HISTO-CHEMICAL STUDY IN RATS**

Chang Yung Chia

Orientadores: Professora Christina Maeda Takiya

Professor Doutor Eduardo Ferreira Manso

Professor Doutor César Silveira Cláudio-da-Silva

Abstract da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cirúrgicas em Medicina

The inflammatory response is inevitable after tissue injury and its consequences can be devastating, it also consists in one of the most serious medical, economic and social problems today. Throughout evolution, the regenerative capacity in wound healing of mammals seems to have been inhibited by immune system development, which blocked relaunch of developmental programs designed to regenerate functional tissue, a phenomenon seen in lower class animals and during the development of the human fetus. Regeneration is the self-restoration of form and function of injured tissue or organ. The ability to understand and control the regeneration process would be the solution for countless medical problems. A great effort has been made in this way, and the fetal wound healing is the research model. It's well known that until the second trimester, the fetal skin wounds heals

without scar formation, and this process seems to be organ dependent, and cell intrinsic, not influenced by the environment. One of most important differences between fetal and adult wound healing, and perhaps a controllable factor, is inflammation. The inflammation and the immune system have been thoroughly researched in the attempt to improve the quality of wound healing and resulting fibrosis, which affects the entire body. The laboratory results of this research are promising, but this is not enough evidence for clinical use. Up to now, there is no commercial product that acts directly in the wound healing process. Andiroba is an Amazonian native plant with anti-inflammatory and eutrophic properties. Previous researches have demonstrated its anti-inflammatory effect, which improved wound healing with faster re-epithelization rate, increased tensile strength and collagen content. The present study evaluated the effects of the commercial formulation of an emulsion containing andiroba oil in induced excisional total skin wound in rats, comparing with a control group. An immunohistochemistry study was performed on days 3, 7, 15 and 20 after wound induction, and the tensile strength is measured at day 20. The inflammation was evaluated during the healing process through morphometric quantification of mast cells, macrophages, myofibroblasts, newly formed capillary vessels, and transforming growth factor  $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3). The treatment group showed a lower number of myofibroblasts and macrophages, and increased quantities of newly formed capillary vessels and TGF- $\beta$ 3, this was statistically significant. The treatment group also had smaller scars, and 30% higher in tensile strength resistance compared to the control group at day 20. We concluded that andiroba oil emulsion modulated the wound healing process with resulting better scar tissue.

Key words: Inflammation; wound healing; regeneration; andiroba; *Carapas guianensis*.



## SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Objetivo	18
3. Fundamentação Teórica	19
Processo de Cura da Lesão Tecidual	
3.1 – Renovação tecidual, Reparação e Regeneração	19
3.2 – Cura por Reparação Cicatrização e Formação de Fibrose	20
3.2.1 – Processo de Cicatrização (Adulto)	20
3.2.2 – Cicatrização Fetal	23
3.3 – O Óleo de Andiroba	26
4. Método	27
4.1 – Considerações éticas	27
4.2 – Animais	27
4.3 – Desenho do Estudo	27
4.4 – Procedimento anestésico e cirúrgico	29
4.5 – Protocolo experimental	29
4.6 – Tratamento	29
4.7 – Cicatrização da ferida	30
4.8 – Ensaio biomecânico	30
4.9 – Processamento da amostra	30
4.10 – Imunohistoquímica	31
4,10,1 – Protocolo da técnica imunohistoquímica	32

4.10.2 – Análise estatística	35
5. Resultados	
5.1 - Macroscopia	35
5.2 - Microscopia	36
5.4 – Quantificação	53
5.4.1 – Mastócitos	53
5.4.2 – Macrófago	54
5.4.3 – Capilares neoformados	55
5.4.4 – TGF $\beta$ 3	56
5.4.5 – Miofibroblasto	57
5.5 – Ensaio biomecânico	58
6. Discussão	59
7. Conclusão	64
8. Referência	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Ácido Hialurônico

BSA - Albumina bovina sérica

CD – Cluster of Diffrentiation (grupo de diferenciação)

CEUA - Comitê de Ética para Uso de Animais

EcOA – Emulsão contendo Óleo de Andiroba

FGF - Fator de Crescimento do Fibroblasto

FGFb - Fator de Crescimento do Fibroblasto básico

FGF-2 - Fator de Crescimento do Fibroblasto 2

HE – Hematoxilina e Eosina

IL- $\beta$ 1 – Interleucina beta 1

M1 – Macrófago classicamente ativado

M2 – Macrófago alternativamente ativado

MEC – Matriz Extra Celular

MMP – Matriz Metaloproteinase

PAF – Fator Ativador de plaquetas

PBS – Tampão fosfato-salina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

pH – potencial de Hidrogênio

TGF – Fator de Crescimento Transformador

TGF- $\alpha$  - Fator de Crescimento Transformador alfa

TGF- $\beta$ 1 - Fator de Crescimento Transformador beta 1

TG - $\beta$ 2 - Fator de Crescimento Transformador beta 2

TGF- $\beta$ 3 - Fator de Crescimento Transformador beta 3

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

TNTP - Tetranortriptenos

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Cinética da cicatrização

**Figura 2** – Cortes histológicos do grupo Manipulação e Manipulação tratado nos diferentes tempos

**Figura 3** - Aspecto comparativo após 3 dias.

**Figura 4** – Aspecto comparativo após 3 dias.

**Figura 5** – Aspecto comparativo após 7 dias.

**Figura 6** – Aspecto comparativo da lesão após 7 dias.

**Figura 7** – Aspecto comparativo após 15 dias.

**Figura 8** – Aspecto comparativo da lesão após 15 dias.

**Figura 9** – Aspecto comparativo após 20 dias.

**Figura 10** - Aspecto comparativo após 20 dias.

**Figura 11** - Marcadores biológicos na ferida após 3 dias, Grupo Não Tratado.

**Figura 12** - Marcadores biológicos na ferida após 3 dias, Grupo Tratado.

**Figura 13** - Marcadores biológicos na ferida após 7 dias. Grupo Não Tratado.

**Figura 14** - Marcadores biológicos na ferida após 7 dias, Grupo Tratado.

**Figura 15** - Marcadores biológicos na ferida após 15 dias Grupo Não Tratado.

**Figura 16** - Marcadores biológicos após 15 dias, Grupo Tratado.

**Figura 17** - Marcadores biológicos após 20 dias. Grupo Não Tratado.

**Figura 18** - Marcadores biológicos após 20 dias, Grupo Tratado.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Diferenças entre a cicatrização fetal e adulta.

**Tabela 2** – Representação do desenho do estudo.

**Tabela 3** – Anticorpos primários utilizados, especificações, recuperação antigênica e diluição empregadas.

**Tabela 4** - Ensaio Biomecânico.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Número de mastócitos por campo.

**Gráfico 2** – Cinética dos macrófagos na ferida nos Grupos Tratado e Não Tratada.

**Gráfico 3** – Cinética do aparecimento de novos capilares durante a reparação da ferida.

**Gráfico 4** – Escore de TGF $\beta$ 3.

**Gráfico 5** - Cinética de miofibroblastos durante a reparação da ferida dos Grupos Tratados e Não Tratados.

## 1. INTRODUÇÃO

Em humanos uma lesão tecidual de qualquer órgão, invariavelmente desencadeia uma reação inflamatória, que inicia o processo de reparação, e resulta numa cicatriz.<sup>1,2</sup> Por mais perfeita que seja, a forma e função resultante dessa reparação é sempre inferior à do tecido original.<sup>3</sup> Por outro lado, qualquer distúrbio durante o processo de reparação, pode levar a não cicatrização, ou, à fibrose.<sup>4</sup> Esse problema atinge todos os órgãos, como a pele, pulmão, rins, fígado, coração, entre outros, e o mecanismo da cicatrização em todos os órgãos é praticamente idêntico.<sup>5</sup> Atualmente, a cicatrização de feridas é um dos maiores problemas social, econômica, e da saúde.<sup>6</sup>

Alguns animais inferiores na escala zoológica como anfíbios, por exemplo, tem a capacidade de regenerar a extremidade do membro quando amputado.<sup>8</sup> Esse fenômeno de curar uma ferida sem a formação de cicatriz é observado também em alguns mamíferos, como no camundongo espinhoso africano (*Acomys spp*)<sup>8</sup>, descoberto recentemente, e, em fetos humanos até o segundo semestre de gestação<sup>9,10</sup>. Inúmeras pesquisas foram e estão sendo desenvolvidas para desvendar o mecanismo da cicatrização fetal, a fim de compreender e controlar o processo da cicatrização e da regeneração. Sabe-se atualmente, que esse processo é basicamente genético, independente do ambiente intra-uterino, e fora do nosso controle<sup>8,9</sup>. Entretanto, uma das maiores diferenças para a cicatrização “adulta” é a ausência, ou a mínima presença, da reação inflamatória na cicatrização fetal<sup>3,6-11</sup>. A primeira fase do processo de cicatrização é a reação inflamatória, e quanto mais intensa for essa reação, maior é a granulação e conseqüente fibrose<sup>1,2</sup>. Nos conceitos atuais, a inflamação não é necessária para iniciar o processo da cicatrização, e, pode até ser deletéria<sup>1,2</sup>. As terapias “anti-fibrótica” atuais visam atenuar ou controlar a inflamação, e obter uma cicatrização de melhor qualidade, e não na velocidade de contração ou de fechamento da ferida, às custas de maior fibrose, como a maioria dos produtos de uso clínico propõem.



O processo de cicatrização é uma reação local e sistêmica, de alta complexidade, envolvendo sistemas neuro-endócrino, hematopoiético, imunológico, interagindo mediadores, células, e o microambiente<sup>12</sup>. Várias substâncias mediadoras foram ou estão sendo estudadas, com resultados laboratoriais promissores, mas nenhuma dessas isoladamente se encontra com eficácia suficiente para o uso clínico. A maioria dos produtos “cicatrizantes” no mercado são basicamente pomadas com efeito hidratante, e antibiótica quando associado a antibióticos, ou a enzimas com efeito de debridamento tecidual. As substâncias que de fato apresentam interferência na cicatrização são o corticoesteróides, porém, de ação atrófica e de difícil controle, e, o ácido retinóico, de efeito hipertrófico sobre colágenos<sup>13</sup>. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) tem efeito deletério na cicatrização<sup>14</sup>. Outros produtos não têm efeito “cicatrizante” comprovado. Até o presente momento, não existe nenhuma substancia que interfira diretamente no processo de cicatrização, acelerando ou melhorando a qualidade da cicatriz. Acreditava-se que a compressão mecânica poderia evitar cicatrizes hipertróficas, no entanto, constatou-se que pressão não acrescenta efeito benéfico nesse processo. Os benefícios comprovados na cicatrização são a oclusão da cicatriz, o ambiente mais estéril possível, e um mínimo de umidade. Talvez a diminuição da reação inflamatória possa melhorar estética e funcionalmente a cicatriz.

A planta amazônica brasileira *Carapas guianensis*, conhecida como andiroba, é usado pelos nativos como anti-inflamatório, anti-alérgico e cicatrizante. É usado também como repelente. A emulsão comercial, além do principal substancia ativa o óleo de andiroba, contem ácido oleico, óleo de melaleuca, lecitina, colágeno hidrolisado, colesterol, óleo de canola, óleo de soja glicina, cetil palmitato, retinil palmitato, acetato de tocoferol, ozokelite, ácido esteárico, manteiga de *Butyrospermum Parkii*etc., Clínicamente, ao emulsão contendo óleo de andiroba (EcOA) é usado no tratamento de queimaduras, escaras, e principalmente, na dermatite de radioterapia nas pacientes tratadas de câncer de mama. A potência anti-inflamatória da EcOA foi comprovada em pesquisas científicas, e tem a vantagem sobre os corticoesteróides de baixa potência por não ter ação atrófica<sup>15,16</sup>. Este produto pode ser uma solução nacional e de baixo custo na prevenção da fibrose cicatricial cutânea.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da Emulsão contendo Óleo de Andiroba (EcOA), formula industrial, na cicatrização da ferida excisional, de espessura total em ratos.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **O Processo da Cura da Lesão Tecidual**

Após uma lesão tecidual, o organismo inicia o processo de cura da ferida. Dependendo do organismo e da extensão do trauma sofrido, a cura desencadeada pode ser pelo processo de cicatrização, resultando num tecido cicatricial com fim de restaurar a integridade do tecido, ou, pode ser pelo processo de regeneração, com recuperação da forma e função original do tecido. Entende-se por reparação o processo da cura por cicatrização com algum grau de regeneração.<sup>17-19</sup>

#### **3.1- Renovação tecidual, Reparação e Regeneração**

A regeneração é a formação “de novo” do tecido, na sua forma e função original. Isso é possível quando estão presentes células progenitoras com a capacidade de desdiferenciação e retomar a programação embrionária de formar a matriz extracelular (MEC), na organização original composta por vários tecidos. Isto é visto em animais como salamandra, por exemplo, que consegue regenerar uma extremidade amputada, com todas as funções e formas originais<sup>6-11</sup>. Em humanos, é observado um crescimento do fígado após a hepatectomia parcial, entretanto, trata-se de uma hipertrofia compensatória, e não uma verdadeira regeneração<sup>17</sup>. Quando a matriz extracelular é preservada após a lesão, esta é “re-povoada” pelas multiplicação e diferenciação das células progenitoras, e recupera-se a função do tecido ou órgão. Quando a matriz é lesada de forma irreversível, não há recuperação, e o processo evolui para a formação de tecido cicatricial, avascular, acelular, e desprovida de função. A reparação é uma combinação de regeneração e cicatrização<sup>17</sup>.

Os tecidos de alta capacidade proliferativa como o sistema hematopoiético, epiderme e trato gastrointestinal, podem apresentar “regeneração” após lesão, deste que as células progenitoras desses tecidos não sejam destruídos. Na verdade, é um processo de renovação celular e tecidual<sup>17</sup>.

A incapacidade de regenerar um tecido ou órgão, perdido ou inibido nos mamíferos ao longo da evolução, é atribuído à necessidade de rápido fechamento da ferida através da formação de cicatriz, para preservar a vida, em detrimento da recuperação funcional do tecido ou órgão. A ausência da formação de blastema, e do processo de regeneração parece ser bloqueados pela rápida resposta imunológica e fibroproliferativa após lesão, nos mamíferos.

### **3.2– Cicatrização e Formação de Fibrose**

Nas lesões graves com destruição do arcabouço estromal e células do parênquima, a cura da ferida se processa por reparação com deposição de colágenos e outros componentes da MEC, formando uma cicatriz.<sup>4,17,</sup>

O termo fibrose é usado para descrever a extensa deposição de colágeno feita pelo fibroblasto sob um estímulo contínuo.<sup>4,17,</sup>

#### **3.2.1 – Processo de Cicatrização (Adulto)**

O processo da cicatrização cutânea é complexo e pode ser dividido arbitrariamente em três fases sobrepostas, a fase da inflamação, da proliferação, e da remodelação. Uma lesão tecidual causa a adesão e agregação plaquetária, e formação de trombo, e ao mesmo tempo, inicia a resposta inflamatória. A fase proliferativa segue com formação de tecido de granulação, proliferação e migração de células do tecido conectivo, e, re-epitelização da superfície da ferida. Na fase de maturação ou de remodelação, envolve a remodelação da MEC e contração cicatricial. Nesse processo, pode haver algum grau de regeneração, dependendo da capacidade proliferativa das células do tecido, do grau da integridade da MEC, e, da resolução do estímulo e da reação inflamatória.<sup>2,17</sup>

A forma mais simples da cura da ferida é a união primária ou por primeira intenção, onde as bordas da incisão cirúrgica, aproximadas por sutura, são limpas e sem infecção, e com mínimo de danos celulares epiteliais, de tecido conectivo, e da

membrana basal epitelial. A re-epitelização ocorre com a formação de uma cicatriz relativamente fina.<sup>2,17</sup>

A reparação de feridas excisionais de largos defeitos da superfície cutânea envolve reações inflamatórias mais intensas, e abundante granulação e de deposição de colágenos, formando cicatrizes mais extensas e geralmente com contração. Essa é a cicatrização secundária ou por segunda intenção, e o mecanismo basicamente é a mesma da de primeira intenção.<sup>2,17</sup>

A fase inflamatória pode ser subdividida em fase vascular e fase celular. Na fase vascular ocorre a hemostasia, a ativação da cascata de coagulação e a formação do trombo. Esse trombo, além de hemácias e plaquetas, contém fibrina, fibronectina, e componentes do sistema do complemento, e, constitui a MEC provisória para migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, atraídas pelos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. A plaqueta, além de desempenhar o papel principal na hemostasia, inicia o processo de inflamação e de regeneração através de liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). A fase celular se caracteriza pelo influxo de leucócitos. Logo após a lesão, os neutrófilos e o monócitos são recrutado pelos fatores quimiotáticos liberados pelo mastócito, que atravessam o capilar para o sítio da lesão. Na fase precoce da inflamação, predominam essas células, que duram poucos dias, e na fase tardia, o número de neutrófilos declina, e os monócitos se transformam em grandes macrófagos fagocíticos e passam a predominar. Os macrófagos liberam vários fatores de crescimento incluindo PDGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF), TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , promovendo angiogênese e formação de tecido de granulação. Além disso, fazem a transição da fase de inflamação para a fase proliferativa. A fase inflamatória geralmente dura duas semanas.<sup>1,2,17</sup>

Na fase proliferativa, predomina a atividade celular, a re-epitelização, a angiogênese, e a fibroplasia.

A re-epitelização envolve a migração e a proliferação de queratinócitos adjacentes formando o frente de epitelização que avança e migra para dentro da ferida, a diferenciação do novo epitélio para epiderme estratificada, e a restauração da zona de membrana basal intacta que conecta a epiderme com a derme subjacente.

Concomitante com a epitelização, ocorre a fibroplasia, que é a proliferação de fibroblastos, a migração para dentro da rede de fibrina formada, e a mudança do seu fenótipo para pró-fibrose e inicia a produção de novo colágeno e de outras proteínas da MEC, que formam o tecido de granulação. Inicialmente, a matriz provisória é composta, além de fibrina e fibronectina, de colágeno tipo III, que posteriormente será substituído por tipo I. o TGF- $\beta$  é o mais importante agente fibrogênico, produzido pela maioria das células do tecido de granulação, e causam a proliferação e migração de fibroblasto, aumento de síntese de colágeno e de fibronectina, e diminui a degradação de MEC por metaloproteinases.<sup>2,17</sup>

Angiogenese é o crescimento de novos vasos para dentro da ferida a partir de brotos quiescentes da vasculatura adjacente a ferida. Em resposta à lesão, as células microvasculares endoteliais iniciam o processo angiogênico de ativação das células endoteliais, degradação local da membrana basal, brotamento penetrando na rede de fibrina, proliferação celular, formação de estrutura tubular, reconstrução da membrana basal.<sup>2,17</sup>

Durante a segunda semana, infiltrado leucocitário, o edema, e o processo da vascularização diminuem, e aumenta o acúmulo de colágeno. A matriz do tecido de granulação original é convertida em cicatriz avascular e esbranquiçada, composta de fibroblastos fusiformes, colágenos condensados, fragmentos de tecido elástico, e outros componentes da MEC. Os apêndices da pele destruídos permanecerão perdidos.<sup>2,17</sup>

A contração da ferida começa logo após a cicatrização e tem o seu auge na segunda semana. A intensidade da contração depende e é proporcional à profundidade da lesão. Nas lesões de espessura total, a contração é parte importante da reparação e responde por 40% da diminuição do tamanho da ferida. Na reparação das feridas de espessura parcial, a contribuição do processo da

contração é menos importante. Os miofibroblastos, principais moduladores da contração, são caracterizados pela expressão de músculo liso  $\alpha$ -actina e vimentina, pela ação de contração na cicatrização, e na produção de componentes da MEC, como colágeno do tipo I. São formados a partir dos fibroblastos sob efeito de PDGF, TGF- $\beta$ 1 e FGF-2, secretados pelo macrófago do sítio da ferida, mas também podem se originar dos fibrocitos, células precursoras da medula óssea, dos pericitos, ou das células epiteliais, através do processo de transição epitélio-mesenquimal.<sup>2,17</sup>

Remodelação consiste em substituição do tecido de granulação por cicatrização, envolvendo mudança da composição da MEC. Com o fechamento da ferida, o colágeno tipo III, predominante no tecido de granulação e característico da derme fetal, é gradualmente degradado e substituído por do tipo I, que compõe 80% do colágeno da pele do adulto sadio. Esse balanço entre síntese e degradação da MEC é predominantemente mediado pela matriz metaloproteinase (MMP), que por sua vez, é finamente controlado por seus ativadores e inibidores, e esse processo é crítico para remodelação da cicatriz.<sup>2,17</sup>

### **3.2.2 - Cicatrização Fetal**

O feto humano de até 6 meses de gestação cura a ferida cutânea com o processo de regeneração, sem a formação da cicatriz. Esse conceito é bem estabelecido desde 1970, entretanto, até o presente momento, o mecanismo ainda não é compreendido.

Esse processo parece ser órgão dependente e celular específico, independente do ambiente. Comparado com a do adulto, a cicatrização fetal apresenta a reação inflamatória diferente e reduzida. As células imunes aparecem em menor quantidade e em menor período de tempo, e são menos ativadas, como no caso de macrófagos, assim como os fatores de crescimento. Estudos demonstraram que fetos com inflamação artificialmente induzidas, repararam com formação de cicatriz, como no adulto. E pesquisas com camundongos sem macrófagos e neutrófilos apresentaram melhores taxas de re-epitelização e

cicatrices reduzidas comparados com o controle, sugerindo que nenhuma célula imune é essencial para o processo de cicatrização<sup>9</sup>.

As interleucinas-6 e 8 são pró-inflamatórias e se encontram diminuídas na cicatrização fetal, mesmo quando o fibroblasto fetal é estimulado por PDGF. A interleucina 10 é o principal regulador na supressão de reação inflamatória, inibidor de IL-6 IL-8, e da migração de células inflamatórias. Animais nocauteados de IL-10 formaram cicatrizes durante a cicatrização fetal, enquanto a manipulação genética na cicatrização adulta, com aumento da expressão de IL-10, diminuiu a resposta inflamatória, diminuiu a deposição anormal de colágenos, e, restaurou a arquitetura normal<sup>20,21</sup>.

A ferida fetal apresenta níveis aumentados de glicosaminoglicanas, como o ácido hialurônico (AH) e sulfato de condroitina, e, o fibroblasto fetal expressa níveis mais altos de receptores de AH. Adição exógena de AH reduz a formação de cicatriz em adultos, enquanto a redução de expressão de AH resulta em fenótipo mais semelhante a cicatrização adulta.<sup>6-11,18</sup>

Durante a cicatrização, o fibroblasto fetal apresenta aumento de expressão de colágeno III, e a deposição de colágeno novo é feita de forma de “cesta”, semelhante a pele íntegra. Na pele fetal, há predomínio de colágeno tipo III sobre colágeno tipo I, sugerindo menor maturidade e menos rigidez, entretanto, essas características não afetam a força tensil da pele. Além disso, a ferida fetal apresenta níveis aumentados de MMPs e níveis diminuídos de seus inibidores durante a cicatrização<sup>22</sup>.

Diferentemente do adulto, que envolve granulação, re-epitelização e movimento ativo do tecido conectivo por contração promovido por miofibroblastos, o fechamento da cicatriz fetal é através de cabo de actina que age como “purse string”. A presença de miofibroblastos na cicatrização fetal é controverso, aparecendo precocemente no processo e com curta permanência. Num estudo *in vitro* evidenciou que o fibroblasto fetal pode se diferenciar em miofibroblasto quando estimulado com TGF- $\beta$ 1 exógeno na fase precoce da cicatrização<sup>3,6-12</sup>.



Comparado com a cicatrização em adultos, na fetal, o TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2, conhecidos como “fibróticos”, apresentam-se de forma transitória, precocemente e em baixos níveis. O TGF- $\beta$ 3 é “antifibrótico”, e se apresenta em níveis mais elevados na cicatrização fetal. Estudos demonstraram que bloqueando o TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 pode reduzir a formação de cicatriz. Enquanto a adição de TGF- $\beta$ 3 exógeno diminui a cicatriz, em algumas espécies<sup>3,11,19</sup>.

A tabela 1 resume as principais diferenças encontradas entre a cicatrização fetal e a pós-natal.

	Cicatrização Fetal	Cicatrização Pós-Natal
Inflamação	Mínima	Robusta
Fatores de Crescimento PDGF FGF TGF $\beta$	Transitório Baixo TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 baixos TGF $\beta$ 3 alto	Sustentado Alto TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 altos TGF $\beta$ 3 baixo
Citocinas pró-inflamatórias IL-6 IL-8	Baixo Baixo	Alto Alto
Citocina anti-inflamatória IL-10	Alto	Baixo
Formação de Tecido de Granulação	Não	Sim
Proteínas MEC Colágeno (relação tipo III : tipo I) Fibronectina tenascina	Tipo III aumentado Alta Deposição precoce Aparecimento precoce	Tipo I aumentado Baixa Deposição tardia Aparecimento tardio
Proteoglicanas e Glicosaminoglicanas Ácido hialurônico Fibromodulina Decorina	Alto Alto Baixo	Baixo Baixo Alto
Mastócitos	Ausente ou imaturo	Abundante
Miofibroblastos	Ausente	Abundante
Integrinas durante re-epitelização	Precoce	Tardio

Tabela 1 – Diferenças entre a cicatrização fetal e adulta<sup>3</sup>.

### 3.3 – O Óleo de Andiroba

O fitoterápico é considerado uma substância obtida exclusivamente de substâncias ativas de plantas. A sua eficácia e segurança são validadas por pesquisas etnofarmacológicas, documentação técnica-científica, ou, evidência clínica. A aplicação de fitoterápicos ainda é incipiente mas as pesquisas em produtos naturais tem se intensificado e incentivado nos últimos anos.

O óleo de andiroba é extraído das sementes da árvore andiroba representada por 2 espécies, *Carapa guianensis* e *Carapa procera* da família *Meliaceae*, ambas provenientes da Amazônia<sup>23</sup>. O óleo de andiroba tem sido utilizado pelos nativos da Amazônia, em doenças da pele, como repelente, como vermífugo e anti-febril, e sua emulsão como emoliente, anti-inflamatório para *rashes* cutâneos, e, como cicatrizante<sup>24</sup>. Os princípios ativos do óleo de andiroba tem sido separados e submetidos a ensaios farmacológicos para demonstração de suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, anti-malárica, anti-oxidante<sup>25,26</sup>, na cicatrização de feridas<sup>27</sup> e como repelente de mosquito<sup>28</sup>. *Carapa guianensis* contém triterpenos, tetraterpenos, alcaloides e limonoides. A atividade anti-inflamatória exercida pelo grupo de seis tetranortriterpenoides (TNTP), que são limonoides, está entre as propriedades mais marcantes do óleo. Pesquisas revelaram que o TNTP inibe a permeabilidade vascular induzida por bradicinina, o fator ativador de plaqueta (PAF), a histamina, e a prostaglandina E2 (PGE2), bem como inibe a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e a mobilização de neutrófilos<sup>29,30</sup>. Testes *in vitro* revelam que o óleo de andiroba possui alta capacidade anti-oxidante, e que não há hematotoxicidade, genotoxicidade ou efeito de mutação genética.<sup>26</sup>

## 4. MÉTODO

### 4.1 - Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) sob parecer nº 185/13, de acordo com as normas contidas na Lei federal 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e as recomendações internacionais sobre a utilização e proteção de animais de laboratório em experimento.

### 4.2 – Animais

Foram utilizados 73 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), adultos e machos, da linhagem Wistar, SPF (*specific pathogen free* – livres de patógenos específicos), peso médio de 250g, procedentes do Biotério do Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ. Os animais foram mantidos, durante todo o experimento, em mesmo ambiente, com temperatura entre  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12h (ciclo claro/escuro), e receberam água potável e alimentação (ração industrial padrão, peletizada e balanceada) *ad libitum*.

### 4.3. Desenho do Estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 07 grupo:

**Grupo Tratado - ferida + tratamento (n= 20);**

**Grupo Não Tratado – ferida (n=20)**

**Grupo Manipulação a- manipulação da pele (n=12)**

**Grupo Manipulação b- manipulação da pele + tratamento (n=12 )**

**Grupo Ensaio Biomecânico a - Tratado - n=3**

**Grupo Ensaio Biomecânico b - Não Tratado – n = 3**

**Grupo Ensaio Biomecânico c - Não Manipulação – n = 3**

Os ratos dos Grupos Tratado e Não Tratado foram submetidos a tricotomia, no dorso do lado esquerdo, e a indução da ferida. Cada grupo foi subdivididos em 4 grupos de 5 ratos, para a coleta de material para análise histopatológica, nos tempos de 3, 7, 15 e 20 dias após a indução da ferida. Os grupos manipulação também foram divididas em 4 subgrupos de três ratos cada, para a coleta de material histológico nos mesmos tempos.

Um outro lote de animais contendo 9 animais foi utilizado para o ensaio biomecânico, realizada no 20º dia após a cirurgia. Utilizou-se os Grupos Tratado (n=3) Não Tratado (n=3), e Não Manipulação (n=3). A tabela 2 resume o desenho do estudo.

<b>Grupo</b>	<b>Tempo D0</b>	<b>Tempo D3</b>	<b>Tempo D7</b>	<b>Tempo D15</b>	<b>Tempo D20</b>
Tratado n = 20	Lesão e tratamento n = 20	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5
Não Tratado n = 20	Lesão n = 20	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5	Biopsia n = 5
Manipulação Tratado n = 12	Manipulação e tratamento n = 12	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3
Manipulação Não Tratado n = 12	Manipulação n = 12	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3	Biopsia n = 3
Ensaio Biomecânico Tratado n = 3	Lesão e tratamento n = 3	-	-	-	Biopsia e ensaio biomecânico n = 3
ensaio biomecânico Não Tratado n = 3	Lesão n = 3	-	-	-	Biopsia e ensaio biomecânico n = 3
ensaio biomecânico Não Manipulação n = 3	-	-	-	-	Biopsia e ensaio biomecânico n = 3

Tabela 2 – Representação do desenho do estudo. n= número de animais utilizados.

#### **4.4 - Procedimento Anestésico e Cirúrgico**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A anestesia foi administrada por via intraperitoneal (IP), com uma mistura de cloridrato de cetamina a 10% na dose 60 mg/kg (Ketalar® 50mg/mL, Laboratórios Pfizer Ltda, Brasil) e cloridrato de xilazina a 2% na dose 10mg/kg (Rompum®20mg/mL, Bayer do Brasil SA, Brasil). Após a indução anestésica, o animal foi posicionado em mesa cirúrgica, em decúbito ventral, com os quatro membros imobilizados. Realizou-se a tricotomia na região dorsal à esquerda, seguida da realização de exérese de fragmento circular de pele de espessura total, de 1,0 cm de diâmetro. Nos animais do Grupo Manipulação, após a tricotomia, efetuou-se manipulação da pele por um período semelhante ao tempo utilizado para a realização da exérese nos Grupos Tratado e Não Tratado.

#### **4.5 - Protocolo Experimental**

Realizou-se a exérese de segmento contendo as bordas da ferida e incluindo o fundo de tecido muscular, nos tempos 3, 7, 15 e 20 dias após a indução da ferida. Em seguida os animais foram submetidos a óbito induzido por de asfixia pelo CO<sub>2</sub>.

#### **4.6 - Tratamento**

A EcOA foi utilizada imediatamente após o procedimento cirúrgico. A ferida foi preenchida com a emulsão contendo óleo de andiroba (EcOA), e aplicada diariamente, durante o período da pesquisa.

#### **4.7 - Cicatrização da ferida**

A reparação da ferida foi avaliada através de fotografias da lesão obtidas nos tempos 3, 7, 15 e 20 dias após a cirurgia.

#### **4.8 - Ensaio biomecânico**

Os ensaios de tração são utilizados para a avaliação da cicatrização de feridas<sup>19</sup>. É uma metodologia que avalia o estado físico-mecânico das feridas. Para a sua realização, utilizou-se o protocolo estabelecido por Garg & Palival, 2011<sup>31</sup>. Um segmento retangular de pele contendo a cicatriz, retirado perpendicularmente ao maior eixo da cicatriz, foi imediatamente banhado em soro fisiológico. A seguir, o fragmento de pele foi mantido preso em uma das extremidades, por uma garra de preensão e a outra extremidade foi conectada a um prato de balança, de metal. Sobre ele foram adicionadas, lentamente, de forma progressiva, unidades de pesos de (pesos de 1, 5, 10, 50 e 100 gramas), até a ruptura da cicatriz. A força tensil de ruptura corresponde ao peso necessário para a ruptura da cicatriz em gramas (medida individual).

#### **4.9 - Processamento da Amostra**

Após a retirada dos fragmentos de pele, estes foram lavados em solução salina gelada e fixados em líquido de Bouin, por imersão, durante cerca de 4 horas seguida de imersão em formol zinco onde permaneceram por 48 horas. Seguiu-se a desidratação dos fragmentos com soluções crescentes de etanol, posteriormente diafanizados com xilol (2 mudas) e impregnados com parafina líquida (2 banhos), ponto de fusão 58°C e emblocados em parafina.

Cortes de 4 µm ou 8 µm para a coloração do Picro-Sirius Red modificado foram obtidos em micrótomo rotativo e recolhidos em lâminas histológicas. Foram realizadas as colorações: Hematoxilina-eosina, Sirius red modificado – para identificar fibras de colágeno (Dolber & Spach, 1993), coloração de orceína (Unna-Tanzer) com oxidação prévia pela oxona (solução aquosa a 1% de monopersulfato de potássio), safranina O-Fast Green para a identificação de mastócitos.

#### 4.10 - Imunohistoquímica

Cortes histológicos (4 µm) foram obtidos dos blocos de parafina de todos os grupos, e recolhidos em laminas previamente silanizadas para imunohistoquímica. Foi utilizada a técnica imunohistoquímica amplificada através da revelação dos anticorpos primários com anticorpos secundários anti- IgG [porção F(ab')<sub>2</sub>] de camundongo ou coelho (*Histofine simple stain for rat tissue –anti mouse*, cat # 414171F e *Histofine simple stain for rat tissue –anti rabbit*, cat # 414181F, respectivamente), para tecido de rato conjugados à polímero-peroxidase da Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan). O substrato cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina – DAB+ liquid (cat # K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA). Os anticorpos primários, a diluição e recuperação antigênica empregadas estão listados na tabela 3.

Anticorpo	Fabricante	Recuperação Antigênica	Diluição
<b>Anti- actina α- músculo liso clone 1A4</b>	Dako CA, USA, cat. M0851 monoclonal camundongo	Microondas- 3 min, Tampão Citrato 0,01M pH 6,0	1: 100
<b>Anti-CD68</b>	AbdSerotec, Raleigh, NC, EUA cat. MCA341R, monoclonal camundongo	Microondas- 5 min, Tampão Citrato 0,01M pH 6,0	1: 100
<b>Anti-Fator VIII</b>	Dako, cat # A082, policlonal coelho	Microondas- 5 min, Tris 0,01M-EDTA pH 9,0	1:100
<b>Anti-TGF-β3 (V)</b>	Santa Cruz Biotechnologies, cat. sc-82, policlonal coelho	Microondas- 5 min, tampão Tris 0,01M-EDTA pH 9,0	1:150

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados, especificações, recuperação antigênica e diluição empregadas.

##### 4.10.1 - Protocolo da Técnica Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados com xileno e hidratados com concentrações decrescentes de álcool e água destilada. Após o bloqueio de ligações inespecíficas dos resíduos aldeídicos livres com borax a 5% e permeabilização com solução de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,2 com 0,5% de Triton® X-100, os

cortes histológicos foram submetidos a diferentes técnicas de recuperação antigênica de acordo com os anticorpos específicos (recuperação com calor, através da panela de vapor (*steamer*), por 20 minutos, em tampão citrato pH 6,0 para TGF $\beta$ 1, recuperação em micro-ondas potência máxima (850 W), por 5 minutos, em tampão citrato pH 6,0 para arginase-1 e CD68; em tampão Tris-EDTA pH 9,0 para o von Willebrand, iNOS e TGF- $\beta$ 3 por 5 minutos). Após resfriamento e lavagem em PBS, foi realizada a inibição da peroxidase endógena com solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol (15 min). Após a lavagem com PBS, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas das imunoglobulinas com o tecido utilizando solução de PBS contendo albumina bovina sérica (BSA) a 10%, gelatina 0,001%, Tween 0,05% e Triton 0,1% : PBS com extrato de fígado de rato (V/V) por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente seguido de incubação com PBS – BSA10%, gelatina 0,001%, Tween 0,05% e Triton 0,1% : PBS com soro normal de cabra a 10% (V/V) também por 30 minutos. Os anticorpos primários foram incubados nas diluições citadas, diluídos em PBS com albumina bovina a 3%, gelatina 0,001%; Tween 0,05% e Triton 0,1%, em câmara úmida *overnight* à temperatura de 4°C. No dia seguinte os cortes histológicos foram lavados em solução de PBS contendo 0,25% de Tween, incubados os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1 hora a temperatura ambiente) e revelados com o substrato cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB<sup>®</sup>, Dako, EUA). Após a lavagem com PBS-Tween, seguida de água destilada (2 vezes), os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 5 minutos e montados com ENTELLAN<sup>®</sup> (MERCK).

## **Quantificações**

Para realização das quantificações, foi utilizado um sistema de captura de imagem composto de uma camera digital (Evolution, Media Cybernetics<sup>®</sup>) acoplada a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon<sup>®</sup>). As imagens de alta resolução (2048



× 1536 *pixels buffer*) foram capturadas em um computador com o programa de captura de imagem Q capture © (Quantitative Imaging Corporation Q Cam Driver D II version 2,0,5).

### **Número de Mastócitos (Safranina O), Miofibroblasto ( $\alpha$ -SMA), Macrófago (CD68), número de secções transversais de capilares neoformados (von Willebrand),**

Foram capturadas imagens de 20 diferentes campos microscópicos por lâmina, de forma aleatória, de cortes histológicos corados pela técnica histoquímica para mastócito ou imunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA, CD68, e Fator VIII (Von Willebrand) utilizando-se a lente objetiva de 40X. Os resultados representam o número de células/campo de grande aumento ou de secções transversais dos capilares corados pelo Fator VIII (endotélio) ou  $\alpha$ -SMA. Estes resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### **Escore histológico para a quantificação de TGF- $\beta$ 3**

Foram capturadas imagens de 20 diferentes campos microscópicos por lâmina, de forma aleatória, da epiderme e da derme, em separado, de cortes histológicos corados pela técnica imunohistoquímica para TGF- $\beta$ 3, utilizando-se a lente objetiva de 40X. Utilizou-se escore numérico, separadamente para a epiderme e para a derme. Para a epiderme considerou-se: 0- ausência; 1- reatividade para TGF- $\beta$ 3 somente na camada basal; 2- reatividade nas camadas suprabasais; 3- reatividade nas camadas basal e suprabasal; 4- reatividade em todas as camadas da epiderme. Para a derme considerou-se: 0- ausência; 1- reatividade nas células inflamatórias/fibroblasto; 2- reatividade nas células endoteliais e células inflamatórias/fibroblasto; 3- reatividade na parede de vasos; 4- reatividade na matriz extracelular. A soma do escore numérico da epiderme com o escore numérico da derme representa o escore numérico total de TGF- $\beta$ 3. Os resultados representam a quantificação de TGF- $\beta$ 3. Estes resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

#### **4.10.2 - Análise estatística**

As variáveis foram analisadas descritivamente, sendo submetidas a um teste de normalidade. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas pelos testes paramétricos t de student, para amostras independentes (two tailed). Para a comparação de mais de dois grupos, foi utilizado o teste One Way Anova e quando obtido o efeito principal foi empregado pós-teste de Hom-Sidak como procedimento de comparação múltipla. Para a análise de variáveis que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para análise de dois grupos e análise de mais de dois grupos, respectivamente.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computador SigmaStat versão 3.0.1. Em todas as análises realizadas foi admitido  $p < 0,05$  (5%) como significativo e as barras utilizadas nos gráficos representam o desvio padrão.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 – Macroscopia

#### Cinética da cicatrização

Na comparação da sequência das fotografias dos Grupos Tratado com Grupo Não Tratado, o primeiro apresenta uma ferida maior até o terceiro dia, a partir daí, começa a diminuir. No sétimo dia, nota-se presença de tecido de granulação no Grupo Tratado, enquanto o Grupo Não Tratado apresenta ainda uma crosta. Além disso, a área da ferida é visivelmente menor. E parece menor a cicatriz do Grupo Tratado nos dias 15 e 20, como mostra na figura 1.

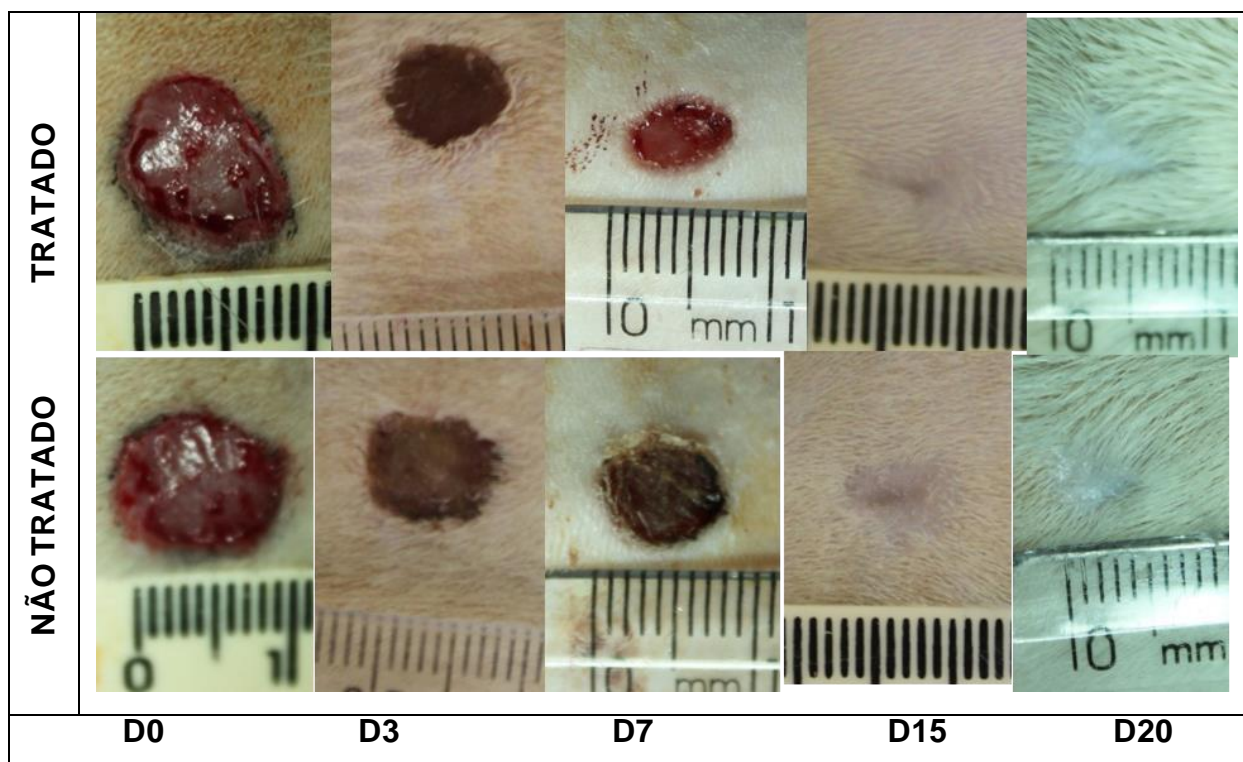


Figura 1 – Cinética da cicatrização.

## 5.2 – Microscopia

### 5.2.1 – Grupo Manipulado e Grupo Manipulado Tratado

Cortes histológicos dos diferentes grupos simulados corados pela HE demonstraram, no terceiro dia, discreto edema intersticial e infiltrado inflamatório na derme tanto no Grupo Manipulado ou Manipulado Tratados (Fig. 2A, B). Nos demais tempos, 7, 15 e 20 dias, não se observou diferenças (Fig. 2C, D, E, F, G, H).

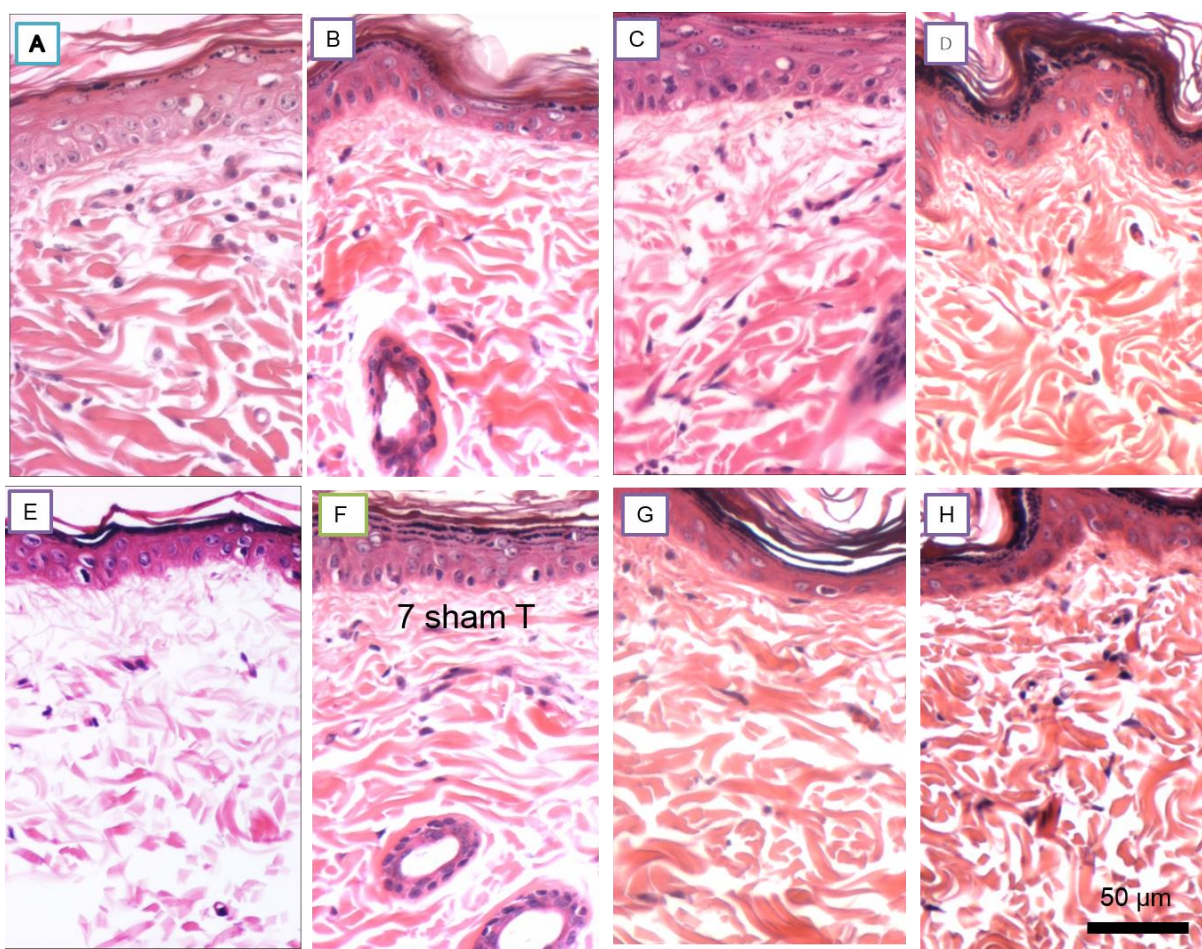


Figura 2 – Cortes histológicas do grupo Manipulação e Manipulação tratado nos diferentes tempos, corados pela HE. Barra: 50 µm.

Grupo Manipulação Não Tratado (A) 3 dias: nota-se discreto edema intersticial e algumas células inflamatórias mononucleares. (B) 7 dias: aspecto normal da pele. (C) 15 dias: aspecto normal da pele. (D) 20 dias: pele também com aspecto normal.

Grupo Manipulação Tratado: (E) 3 dias: Edema intersticial na derme. (F) 7 dias: aspecto normal da derme. (G) 15 dias: derme com aspecto normal. (H) 20 dias: Pele com aspecto semelhante a do grupo Grupo Manipulação Não Tratado.

### 5.2.2 – Grupo Tratado e Não Tratado - terceiro dia

Cortes histológicos corados pela HE demonstraram, no terceiro dia, maior número de células inflamatórias no grupo Não Tratado, que também exibiu uma superfície maior de área sem epitélio, e recoberta por debris celulares e fibrina. (Fig. 3A). A ferida é menor no grupo Tratado que no grupo Não Tratado (Fig. 3B).

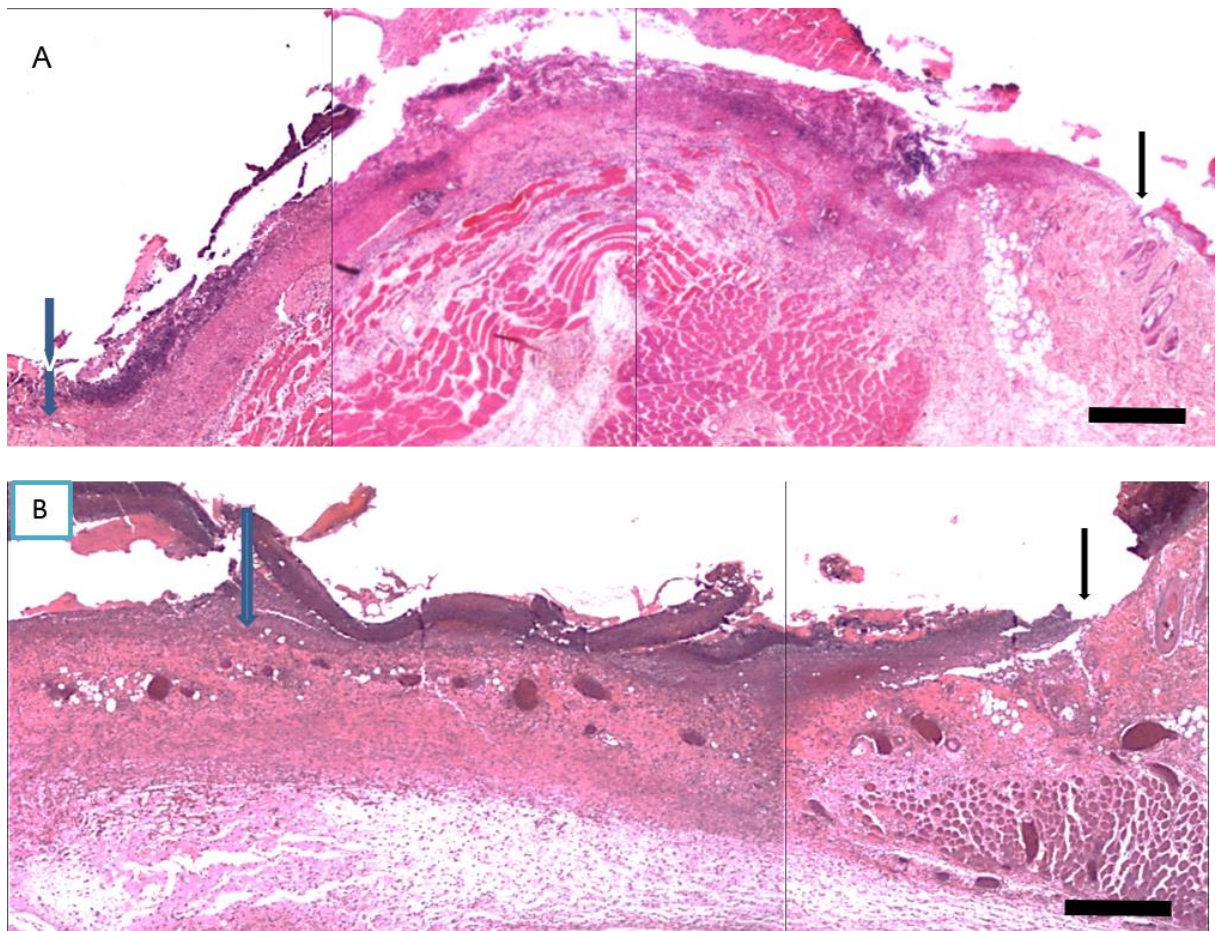


Figura 3 - Aspecto comparativo após 3 dias. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 20x.

(A) Grupo Não Tratado. As setas indicam as bordas da ferida.

(B) Grupo Tratado. As setas indicam as bordas da ferida.

No terceiro dia, nota-se ainda que a lesão é maior no grupo Não Tratado, e com aspecto do infiltrado inflamatório subjacente à crosta formada (Fig. 4A).

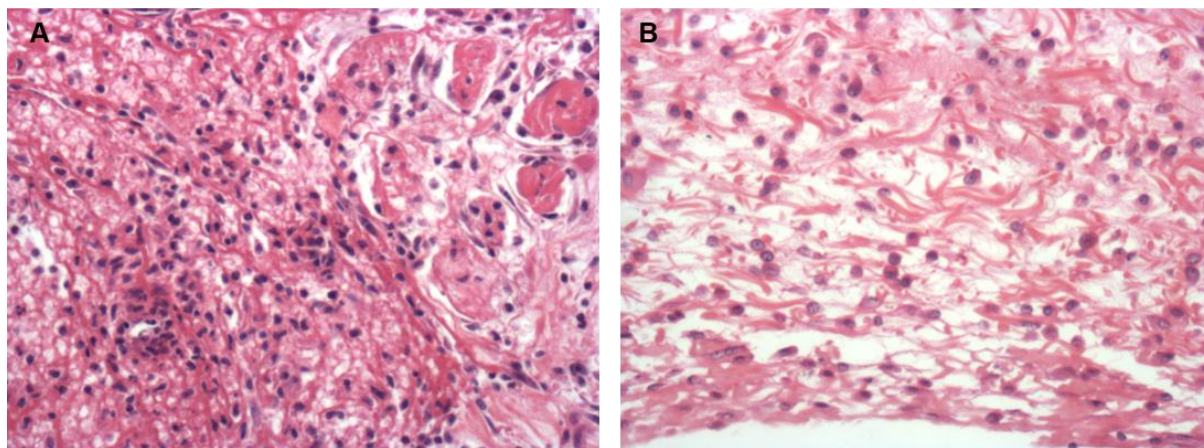


Figura 4 – Aspecto comparativo após 3 dias. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 20x.

(A) Grupo Não Tratado.

(B) Grupo Tratado.

## Grupo Tratado e Não Tratado - sétimo dia

A ferida do Grupo Não Tratado ainda está recoberta por debris celulares e fibrina, com re-epitelização somente nas bordas. Nota-se frente de re-epitelização recobrindo quase toda a lesão no Grupo Tratado (Figuras 5A). As bordas da ferida são menores que a do Grupo Não Tratado, e a ferida se encontra quase toda re-epitelizada, além de apresenta a formação de tecido de granulação exuberante.

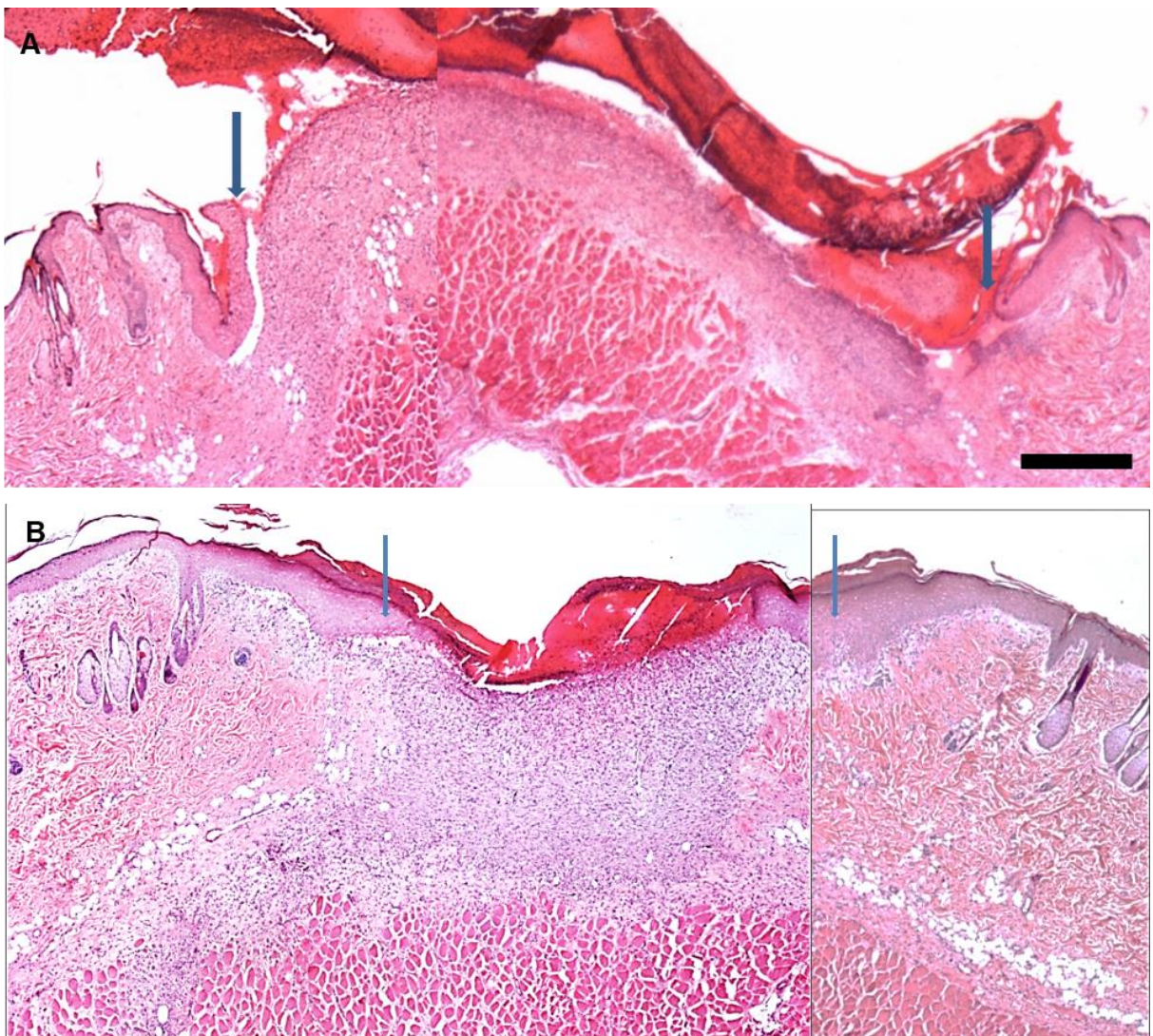


Figura 5 – Aspecto comparativo após 7 dias. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 20x

(A) Grupo Não Tratado. As setas indicam as bordas da ferida.

(B) Grupo Tratado. Aumento original: 20x.

No sétimo dia, o Grupo Não Tratado apresenta aspecto do tecido de granulação subjacente ao local da re-epitelização, com grande quantidade de infiltrado inflamatório entre os capilares neoformados (Fig. 6 A, B). O grupo Tratado apresenta aspecto do tecido de granulação subjacente ao local da re-epitelização com menor quantidade de infiltrado inflamatório entre os capilares neoformados. Notar uma melhor organização do tecido de granulação (Fig. C, D).

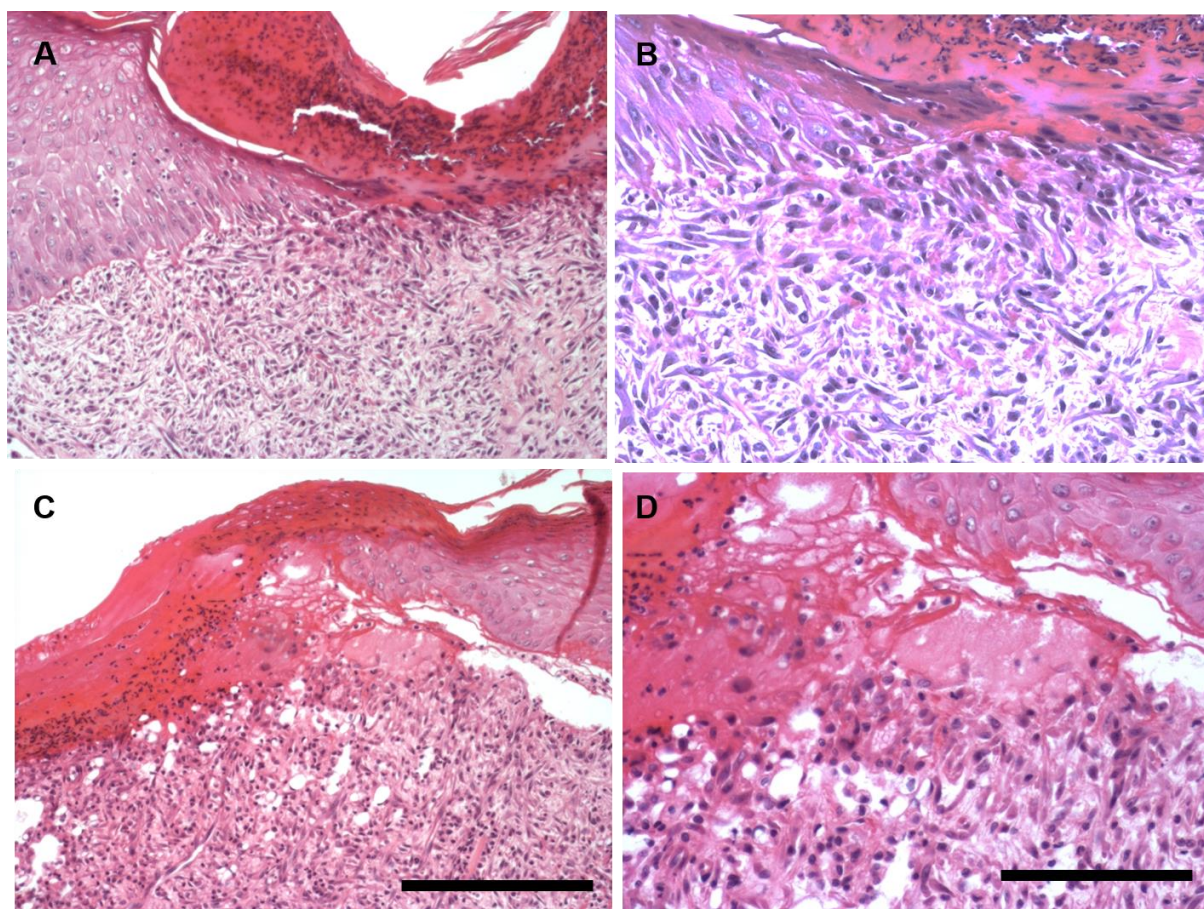


Figura 6 – Aspecto comparativo da lesão após 7 dias. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina.

(A) Grupo Não Tratado. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 10x.

(B) Grupo Não Tratado. Barra: 100  $\mu$ m. Aumento original: 20x.

(C) Grupo Tratado. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 10x.

(D) Grupo Tratamento. Barra:100  $\mu$ m Aumento original: 20x.



Grupo Tratado e Não Tratado – décimo quinto dia

Nos dias 15 e 20, a lesão se apresenta totalmente epitelizada em ambos os grupos (Figuras 7 e 9), exibindo deposição de colágeno.

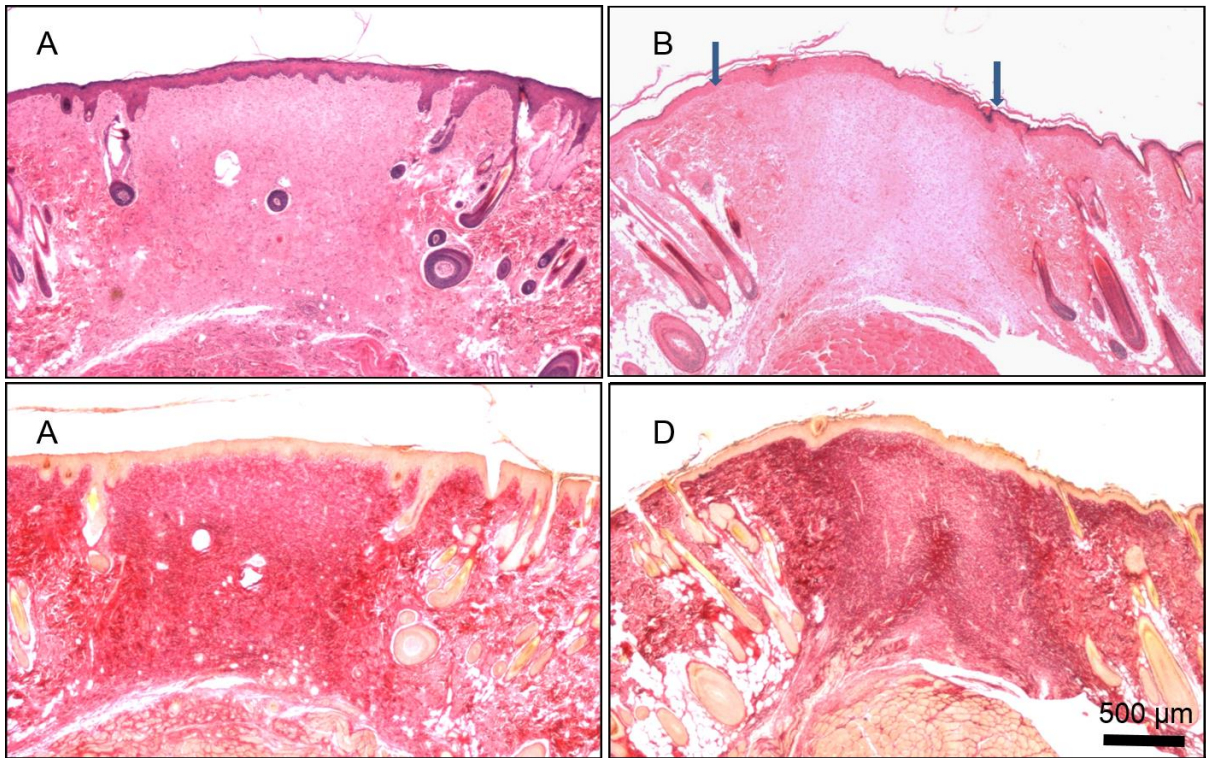


Figura 7 – Aspecto comparativo após 15 dias.

(A) Grupo Não Tratado. Corte histológico de pele, corado pela HE. Aspecto da cicatriz. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 2x

(B) Grupo Tratado. Corte histológico de pele corado pela HE. Aspecto da cicatriz. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 2x

(C) Grupo Não Tratado. Corte histológico corado pelo picro-sirius. Aspecto da cicatriz. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 2x

(D) Grupo Tratado. Corte histológico corado pelo picro-sirius. Aspecto da cicatriz. Barra: 500  $\mu$ m. Aumento original: 2x

Nos grupos 15 e 20 dias já se observa a orientação das células fibroblastoides não havendo aparentemente muita diferença entre os grupos (Figuras 8, 10).

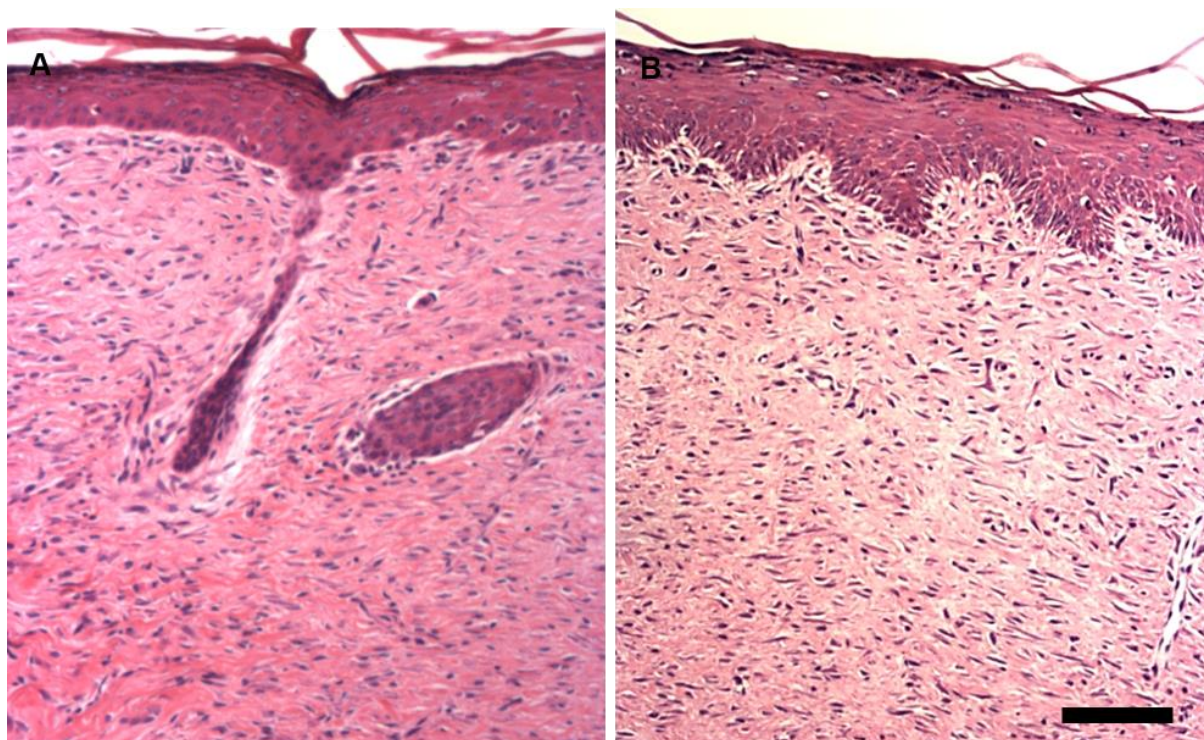


Figura 8 – Aspecto comparativo da lesão após 15 dias. Corte histológico corado pela HE.

( A ) Grupo Não Tratado. Aspecto da cicatriz. Notar a orientação dos fibroblastos e a adesão da epiderme à derme. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 200x.

( B ) Grupo Tratado. Aspecto da cicatriz. Notar a presença de capilares entre os fibroblastos. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 200x.

Grupo Tratado e Não Tratado - vigésimo dia

No dia 20, a lesão se apresenta totalmente epitelizada e menor no Grupo Tratado (fig. 9).

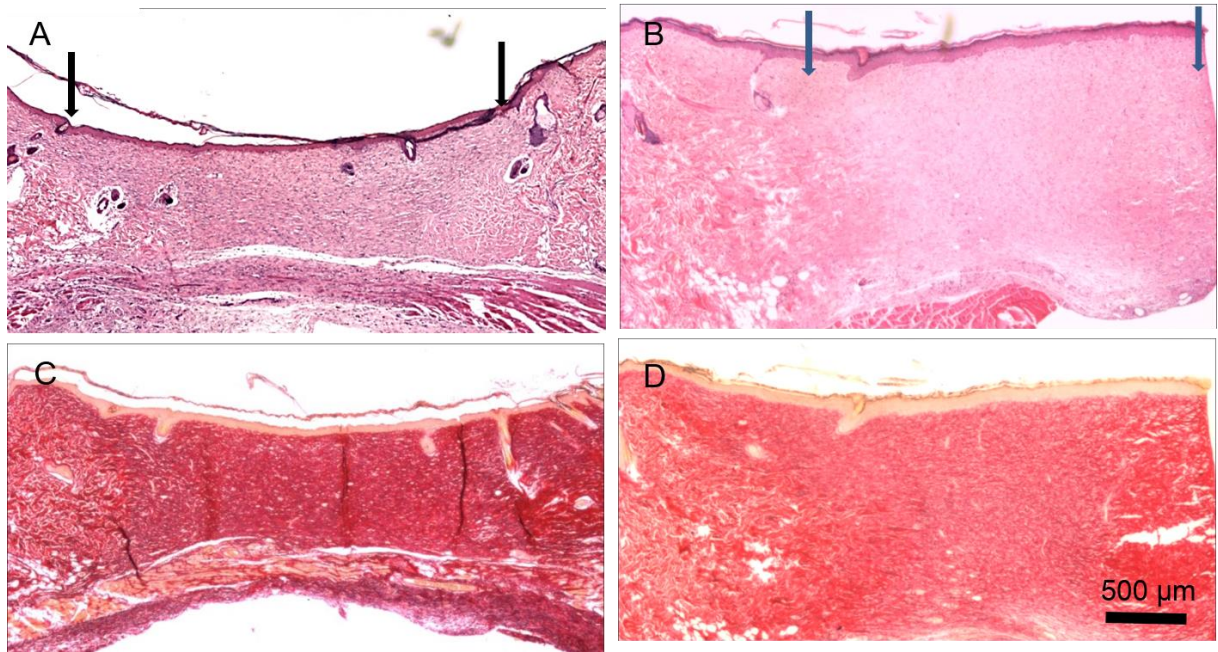


Figura 9 - Aspecto comparativo após 20 dias.

(A) Grupo Não Tratado. Corte histológico corado pela HE. Aspecto da cicatriz. Barra: 500 µm. Aumento original: 2x

(B) Grupo Tratado. Corte histológico dias corado pela HE. Aspecto da cicatriz. Barra: 500 µm. Aumento original: 2x

(C) Grupo Não Tratado. Corte histológico corado pelo picro-sirius. Aspecto da cicatriz. Barra: 500 µm. Aumento original: 2x

(D) Grupo Tratado. Corte histológico corado pelo picro-sirius. Aspecto da cicatriz. Barra: 500 µm. Aumento original: 2x

Observe a orientação das células fibroblastóides (Fig. 10).

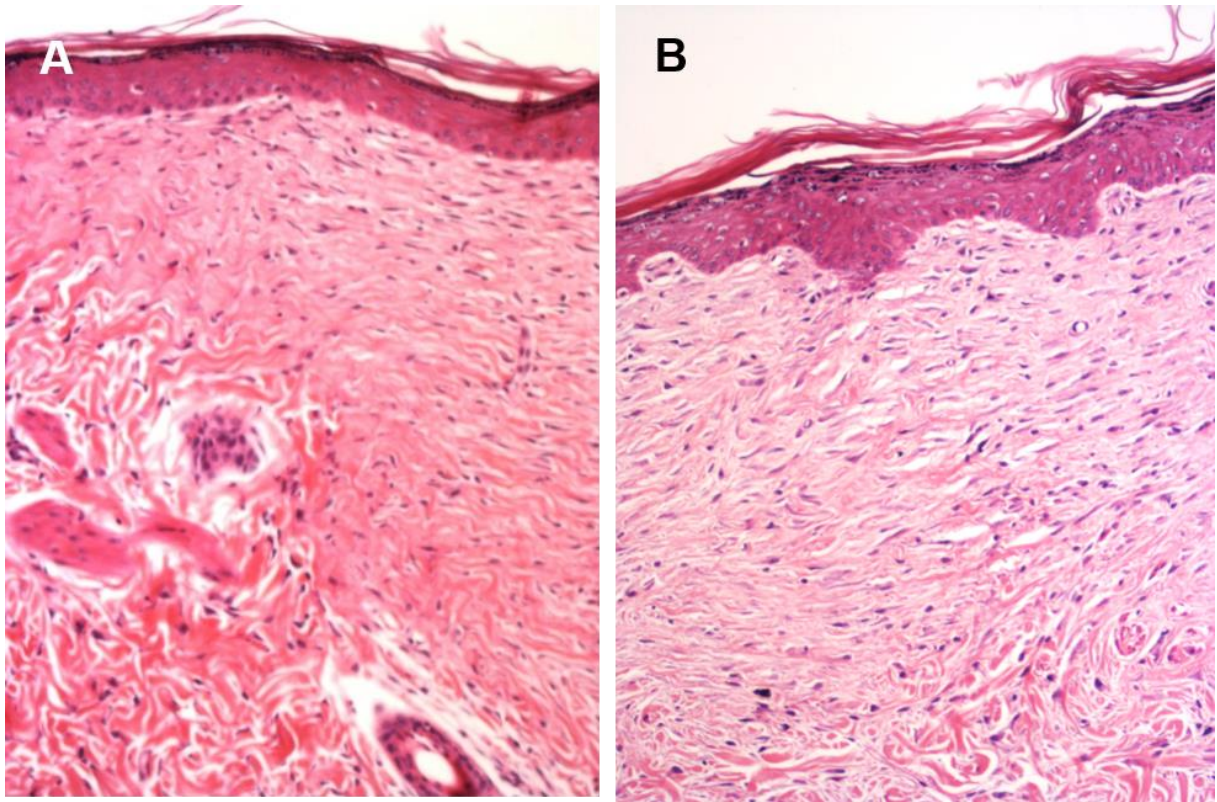


Figura 10 - Aspecto comparativo após 20 dias. Corte histológico corado pela HE. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 200x.

(A). Grupo Não Tratado. Aspecto da cicatriz.

(B) Grupo Tratado. Aspecto da cicatriz.

Os marcadores utilizados puderam demonstrar a presença de capilares neoformados a partir do dia 3 (Figura 11). macrófagos abundantes no grupo controle em todos os tempos (Figuras 11 -19), miofibroblastos no dia 7 no grupo controle e a partir do dia 7 até o dia 15 no grupo tratado (Figuras 13, 14, 16) e TGF- $\beta$ 3 presente na epiderme (Figuras 11-17) e na derme (Figuras 15-18).

No 3o dia, o Grupo Não Tratado apresenta tecido subjacente à borda revestida por crosta. Capilares neoformados negativos ou fracamente positivos para o Fator VIII. Tecido subjacente à borda revestida por crosta apresentando inúmeros macrófagos reativos ao CD68, com pericitos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma, e, epitélio existente na borda da ferida fracamente reativo ao TGF- $\beta$ 3 (escore 1). Ausência de imunoreatividade da derme (Fig. 11).

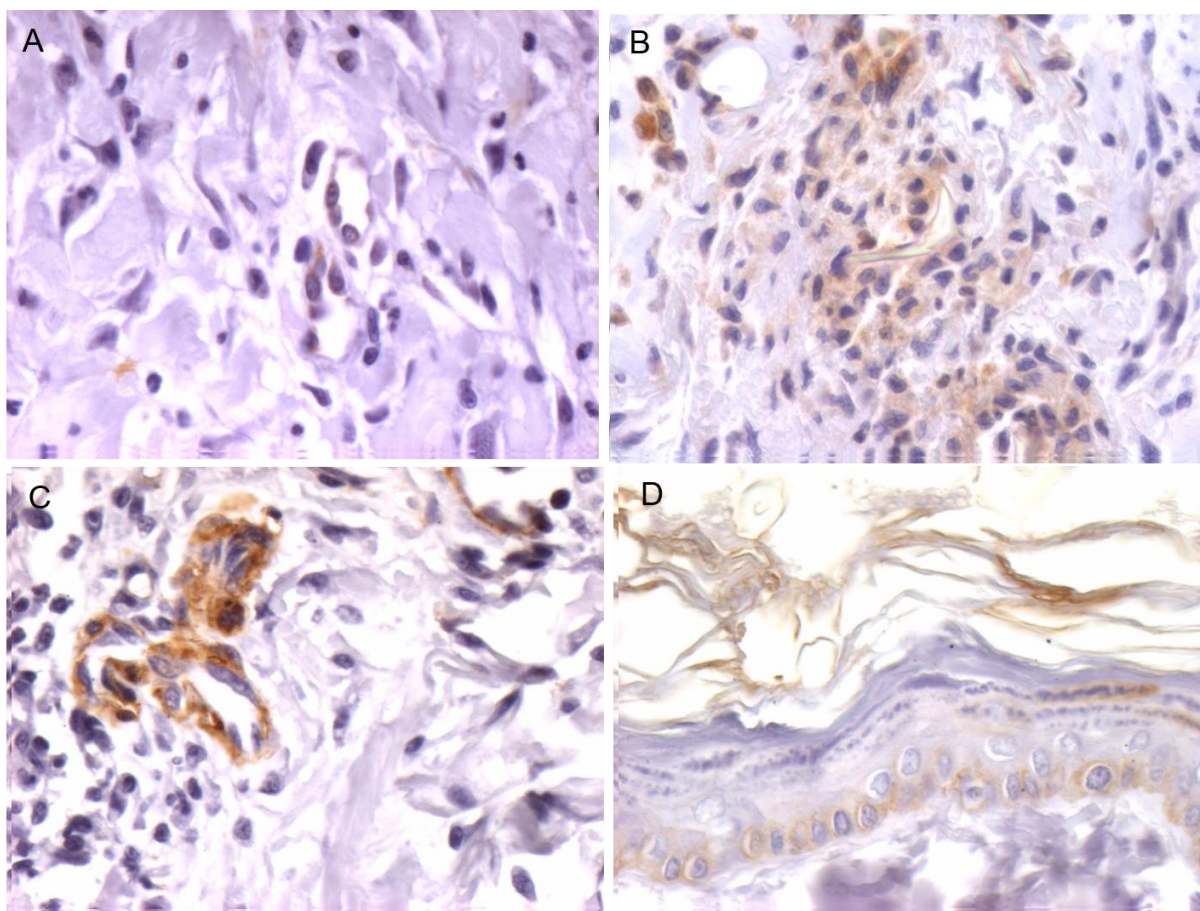


Figura 11 - Marcadores biológicos na ferida após 3 dias, Grupo Não Tratado. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3.

No Grupo Tratado no 3º dia, observa-se tecido subjacente à borda revestida por crosta. Endotélio dos capilares neoformados imunorreativos para o Fator VIII, e inúmeros macrófagos reativos ao CD68, além de exibir pericitos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma, e camadas suprabasais fracamente reativas ao GF- $\beta$ 3 (escore 2) mas com alguns queratinócitos fortemente reativos (Fig. 12).

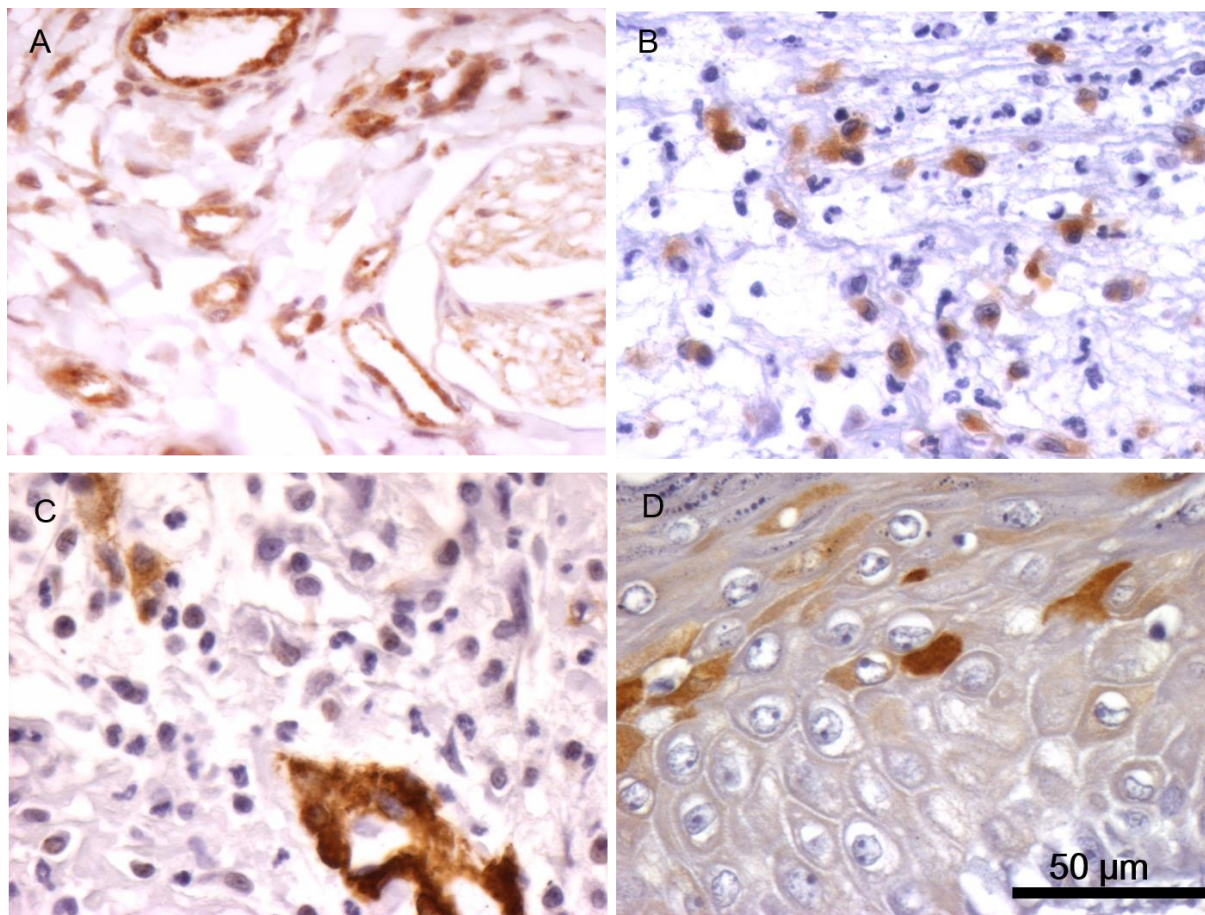


Figura 12 - Marcadores biológicos na ferida após 3 dias, Grupo Tratado. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3.

O grupo Não Tratado apresenta no 7o dia: capilares neoformados negativos ou fracamente positivos para o Fator VIII, tecido de granulação apresentando macrófagos reativos ao CD68, e com pericitos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma. Notar algumas células fibroblastoides também reativas ao anticorpo, e, epitélio existente na borda da ferida exibindo reatividade fraca na camada basal e suprabasais para o TGF- $\beta$ 3 (escore 1). Ausencia de imunoreatividade da derme (Fig. 13).

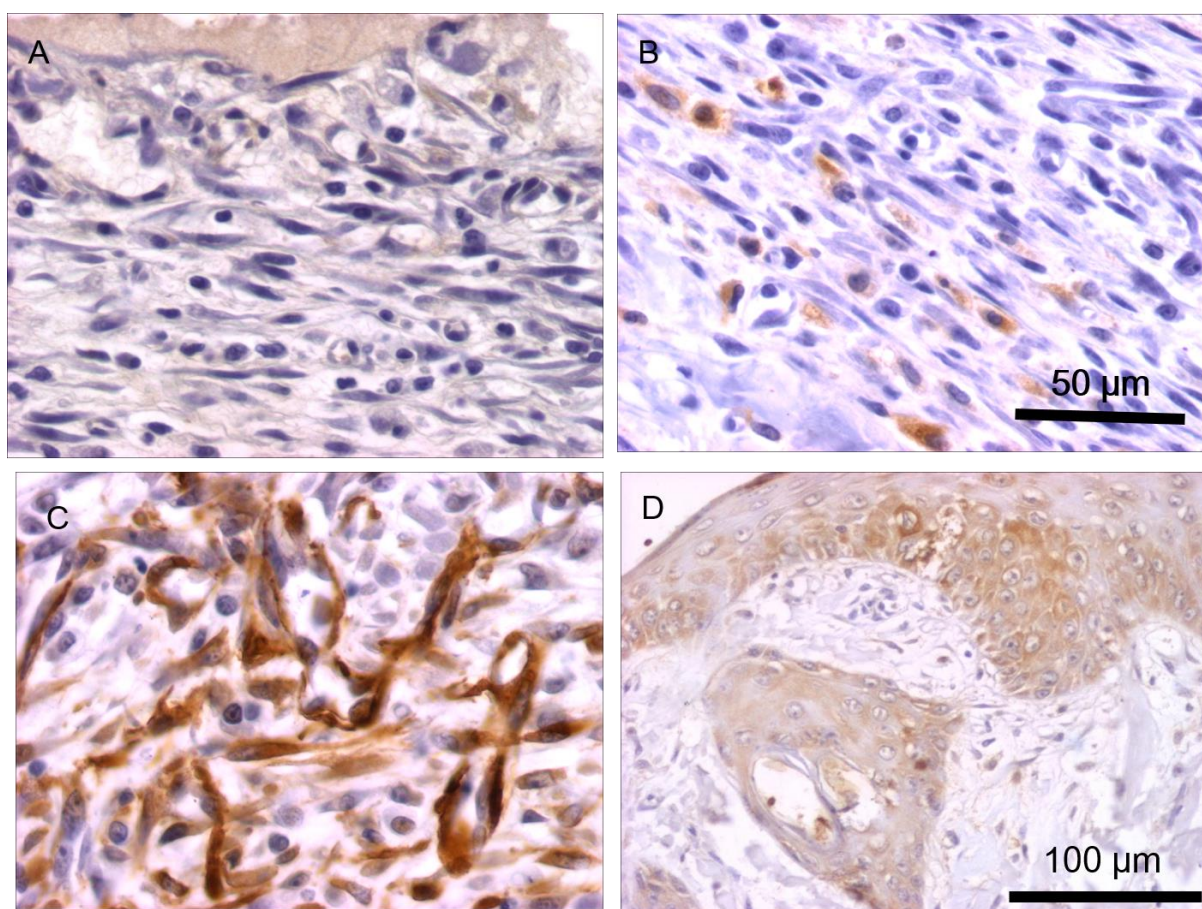


Figura 13 - Marcadores biológicos na ferida após 7 dias. Grupo Não Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 100  $\mu$ m. Aumento original: 10x

No 7º dia: tecido de granulação exibindo endotélio dos capilares neoformados positivos para o Fator VIII, macrófagos reativos ao CD68, e grande quantidade de miofibroblastos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma. Epitélio existente ao lado da ferida exibindo reatividade fraca na camada basal e suprabasais para o TGF- $\beta$ 3 (escore 2) (Fig. 14).

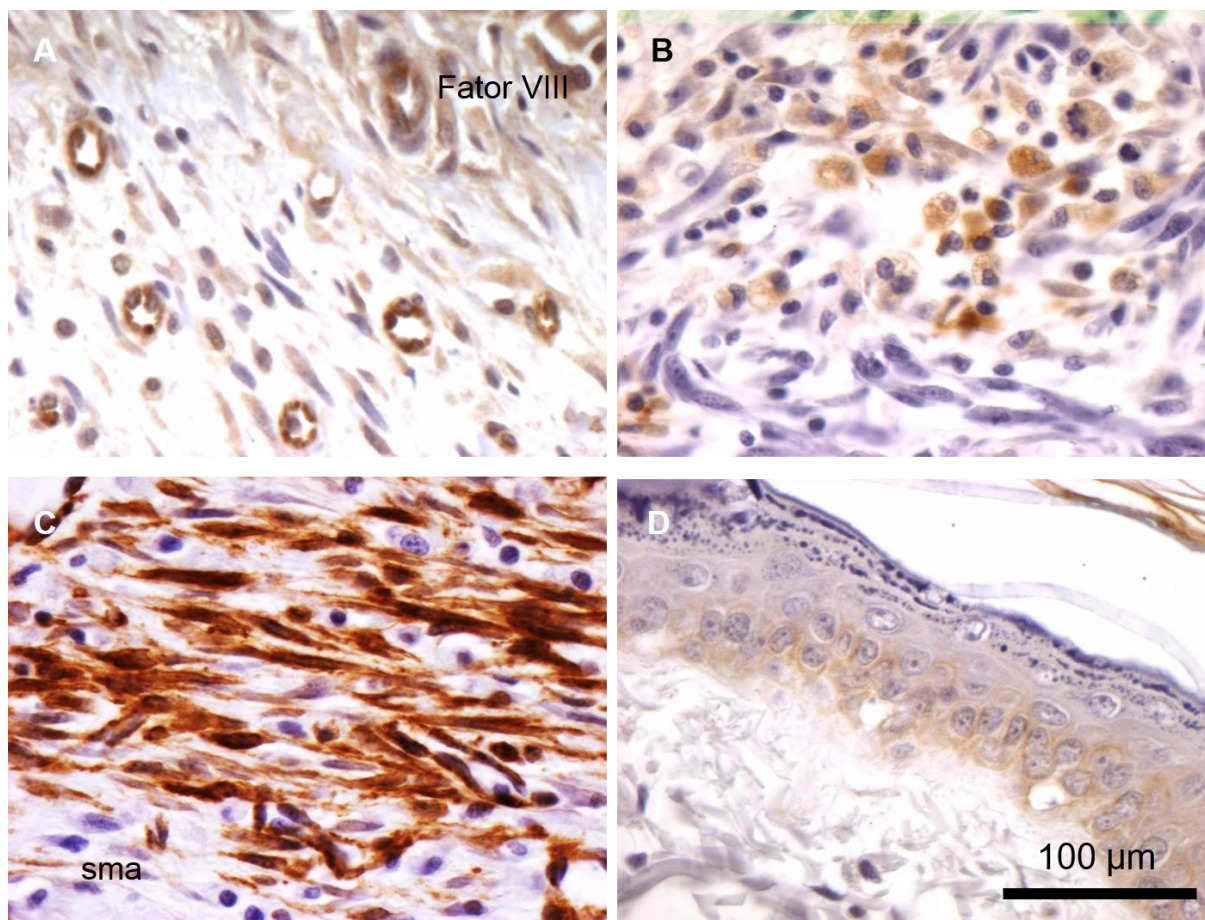


Figura 14 - Marcadores biológicos na ferida após 7 dias, Grupo Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 100  $\mu$ m. Aumento original: 10x.



No 15º dia, o grupo Não Tratado apresenta: capilares neoformados negativos ou fracamente positivos para o Fator VIII, tecido de granulação apresentando macrófagos reativos ao CD68, pericitos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma, e, epitélio existente na borda da ferida exibindo reatividade fraca em todas as camadas da epiderme para o TGF- $\beta$ 3 (escore 4). Reatividade em algumas células da derme (Fig. 15).

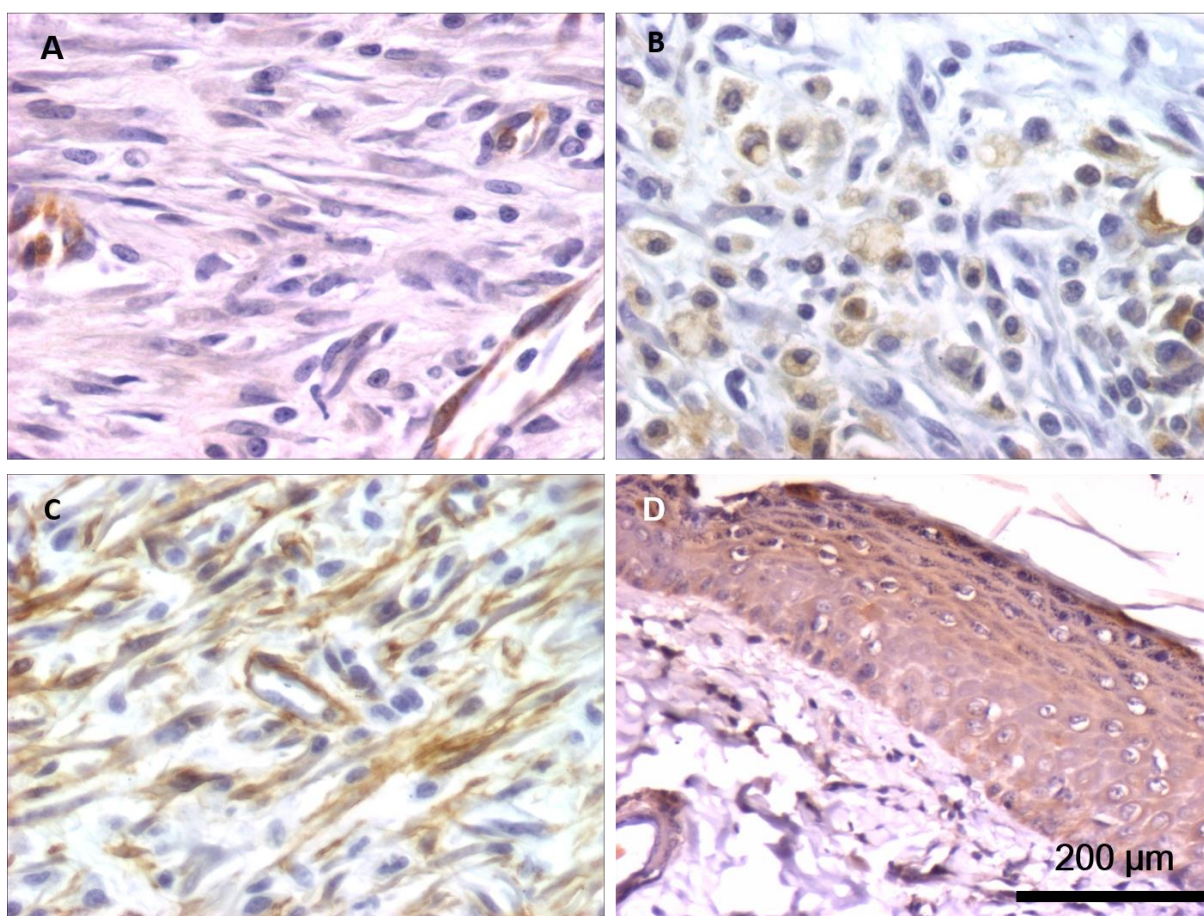


Figura 15 - Marcadores biológicos na ferida após 15 dias, Grupo Não Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 20x

O Grupo Tratado apresenta, no dia 15: tecido de granulação exibindo endotélio dos capilares neoformados positivos para o Fator VIII, macrófagos reativos ao CD68, pericitos fortemente reativos ao anticorpo e presença de miofibroblastos também reativos ao  $\alpha$ -sma, e, Imunoreatividade na derme em células inflamatórias e fibroblastoides (Fig. 16).

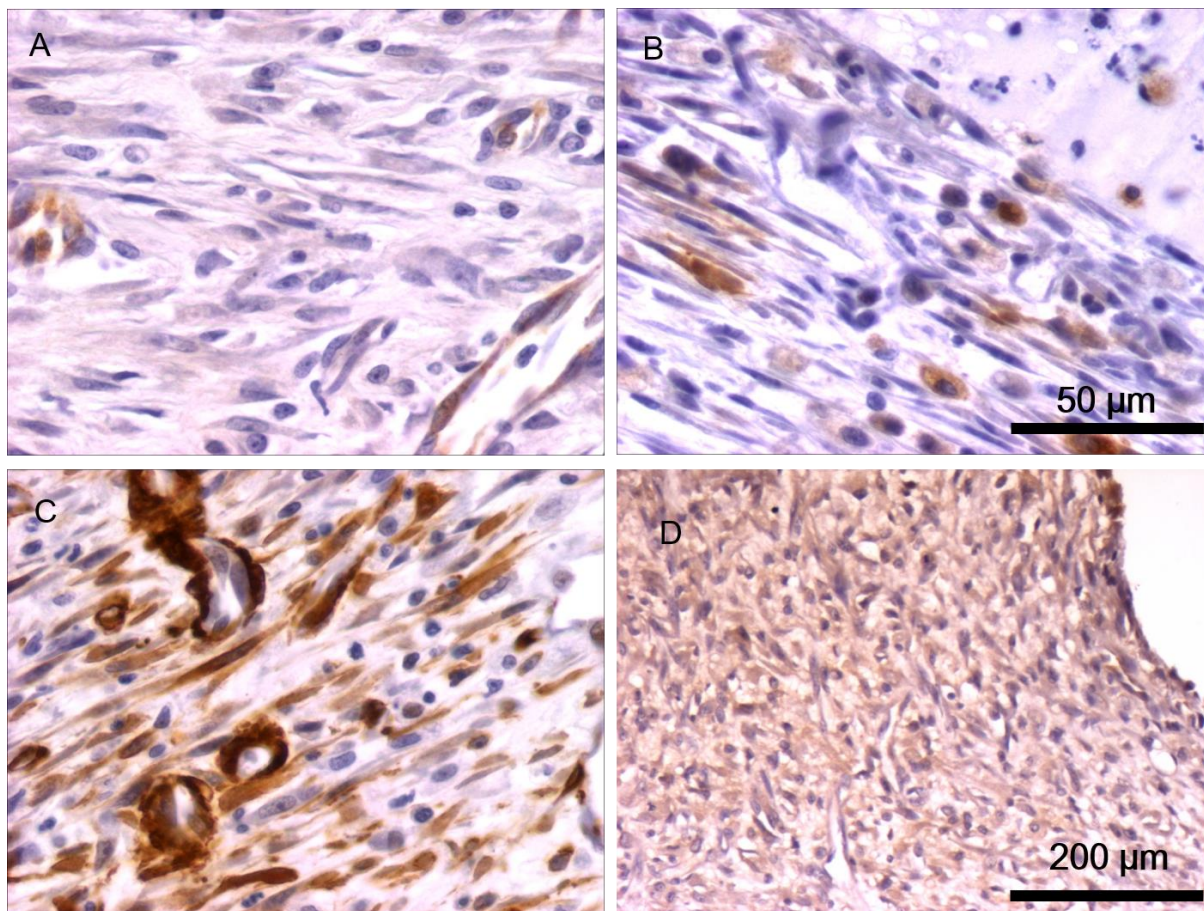


Figura 16 - Marcadores biológicos após 15 dias, Grupo Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 200  $\mu$ m. Aumento original: 10x.

O Grupo Tratado no 20º dia: menor número de capilares neoformados negativos ou fracamente positivos para o Fator VIII, derme com poucos macrófagos reativos ao CD68, tecido exibindo poucos capilares exibindo pericitos reativos ao anticorpo  $\alpha$ -sma. Miofibroblastos ausentes. Epitélio sobrejacente a cicatriz exibindo reatividade fraca em todas as camadas da epiderme para o TGF- $\beta$ 3 (escore 4). Reatividade em algumas células da derme (Fig. 17).

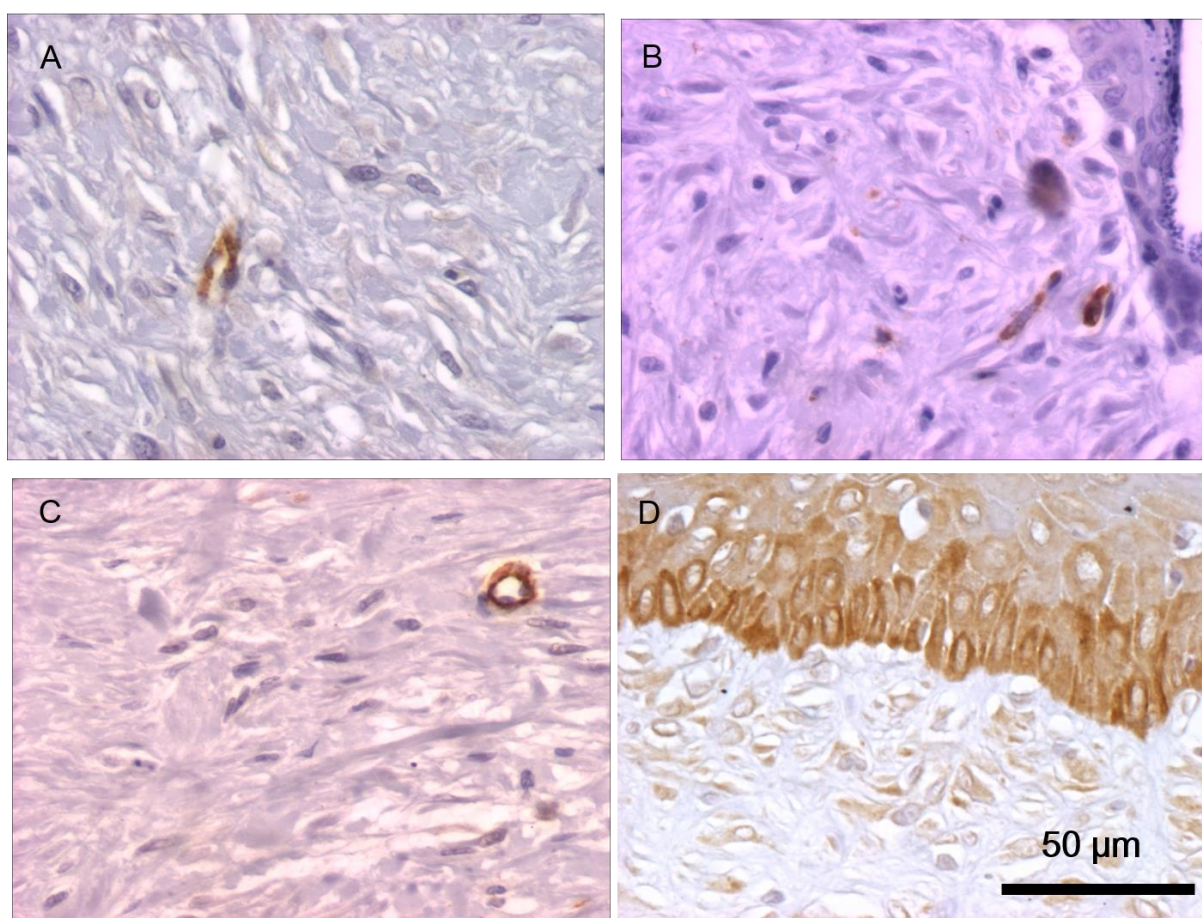


Figura 17 - Marcadores biológicos após 20 dias. Grupo Não Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 50  $\mu$ m. Aumento original: 20x.

No 20o dia, Grupo Tratado: tecido sobrejacente a cicatriz, celular exibindo endotélio dos capilares fracamente positivos para o Fator VIII, derme exibindo alguns macrófagos dentro de capilares, e pericitos fortemente reativos ao anticorpo. Ausência de miofibroblastos. Imunoreatividade na derme principalmente em células fibroblastoides e epiderme fortemente reativa (Fig. 18).

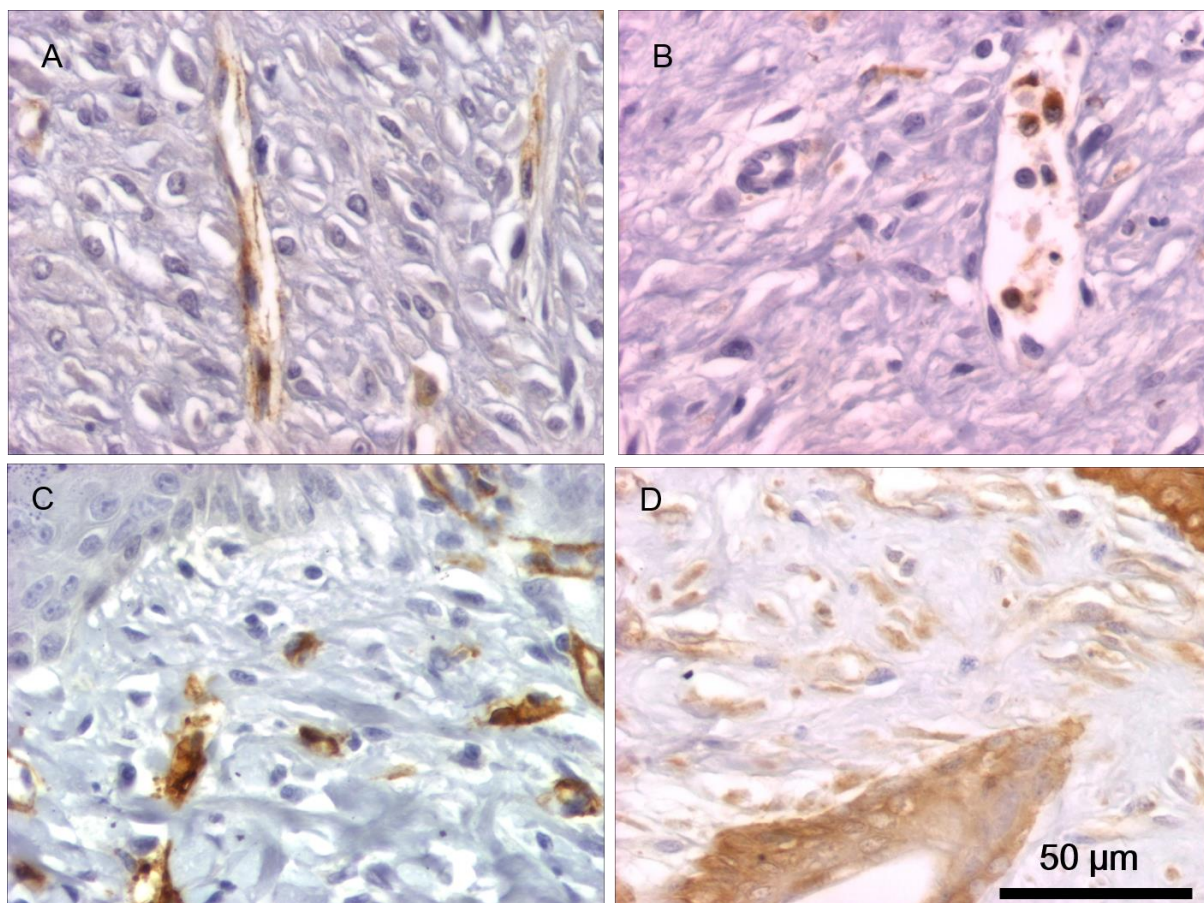


Figura 18 - Marcadores biológicos após 20 dias, Grupo Tratado. (A) Corte histológico imunomarcado para o Fator VIII. Barra: 50 µm. Aumento original: 40x. (B) Corte histológico imunomarcado para CD68. Barra: 50 µm. Aumento original: 40x. (C) Corte histológico imunomarcado para a isoforma alfa de músculo liso ( $\alpha$ -sma). Barra: 50 µm. Aumento original: 40x. (D) Corte histológico imunomarcado para TGF- $\beta$ 3. Barra: 50 µm. Aumento original: 10x.

## 5.3 - Quantificação Morfométrica

### 5.3.1 - Mastócitos

O Grupo Tratado apresentou número menor de mastócitos nos tempos D3, D7 e D20, estatisticamente não significante, e quantidade discretamente maior no D15, comparado com o Grupo Não Tratado, que teve o comportamento cinético semelhante, mas com elevação importante, apesar de não significante, no vigésimo dia (gráfico 1).

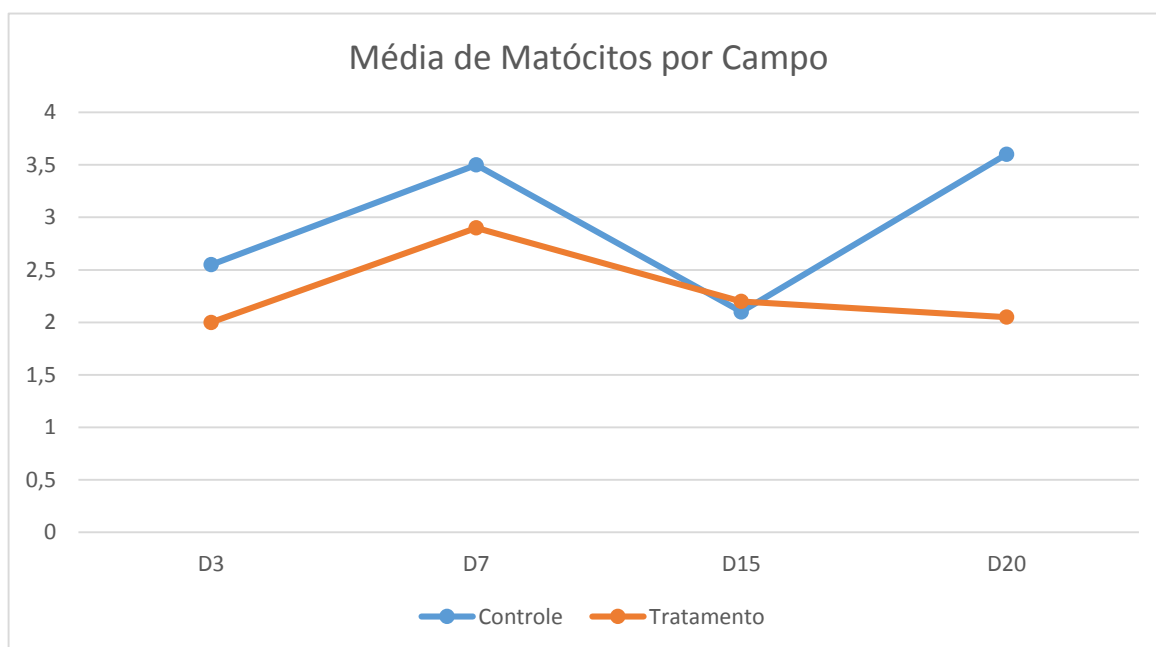


Gráfico 1 – Número de mastócitos por campo. Cinética da população de mastócitos nos Grupos Tratado e Não Tratada. Os mastócitos foram corados pela safranina O e quantificados. Resultados demonstram a média de mastócitos presente nos campos histológicos (40x) nos diferentes tempos. Diferença entre os grupos estatisticamente não significantes.

### 5.3.2 - Macrófagos

O Grupo Tratado apresentou quantidade maior de macrófagos no 3º dia, e queda subsequente e progressiva nos dias 7 e 15, com estabilização e discreto aumento no dia 20. O grupo Não Tratado teve o comportamento cinético inverso, com número menor no D3, crescimento significativo no D7, discreto declínio no D15, e queda importante no D20. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa em todos os tempos (gráfico 2).

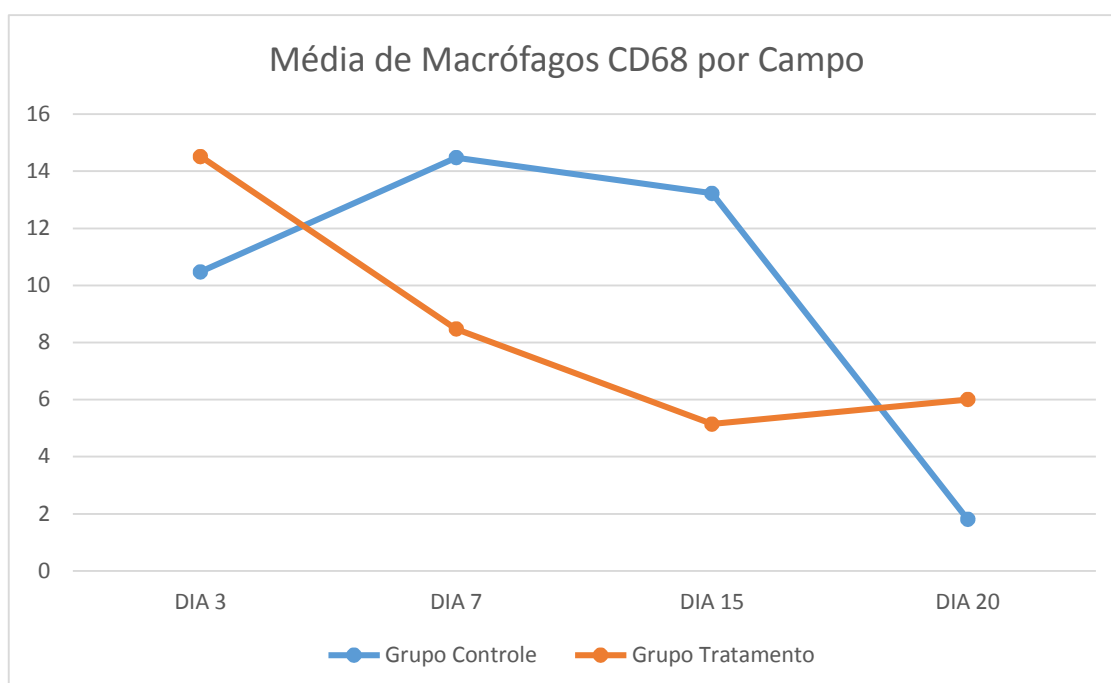


Gráfico 2 – Cinética dos macrófagos no Grupo Tratado e Não Tratado. Os macrófagos foram identificados pela imunoreatividade para o antígeno CD68 e quantificados/campo (40x lente objetiva). Resultados demonstram a média de macrófagos CD68 presente nos campos histológicos nos diferentes tempos, com diferença estatisticamente significantes.

### 5.3.3 - Capilares neoformados

Os capilares neoformados foi mais numeroso no Grupo Tratado em todos os tempos, estatisticamente significativa, com uma forte ascensão no D15, e diminuição no D20, em ambos grupos (gráfico 3).

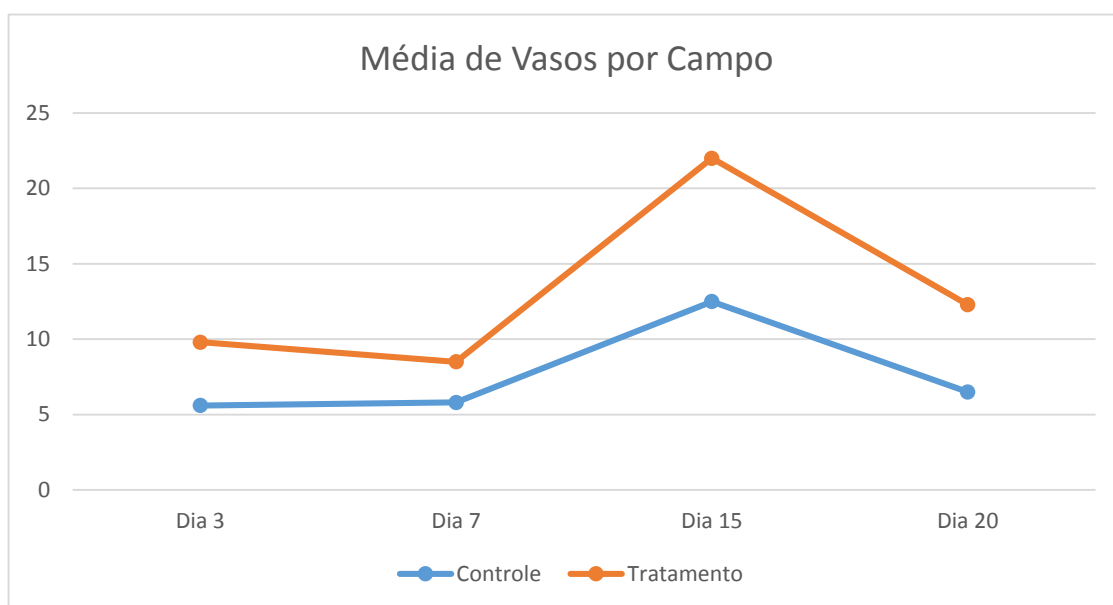


Gráfico 3 – Cinética do aparecimento de novos capilares durante a reparação da ferida. Os capilares foram identificados através da imunoreatividade para o fator VIII da coagulação (Von Willebrand) ou a isoforma alfa de músculo liso nas fotomicrografias (40x). Resultados demonstram a média de capilares presente nos campos histológicos dos Grupos Tratados e Não Tratados nos diferentes tempos.

### 5.3.4 - TGF $\beta$ 3

O escore de TGF $\beta$ 3 no Grupo Tratado foi superior e estatisticamente significativo em todos os tempos. O comportamento da cinética foi basicamente estável nos tempos, com uma tendência a elevação no 20º dia no Grupo Tratado (gráfico 4).

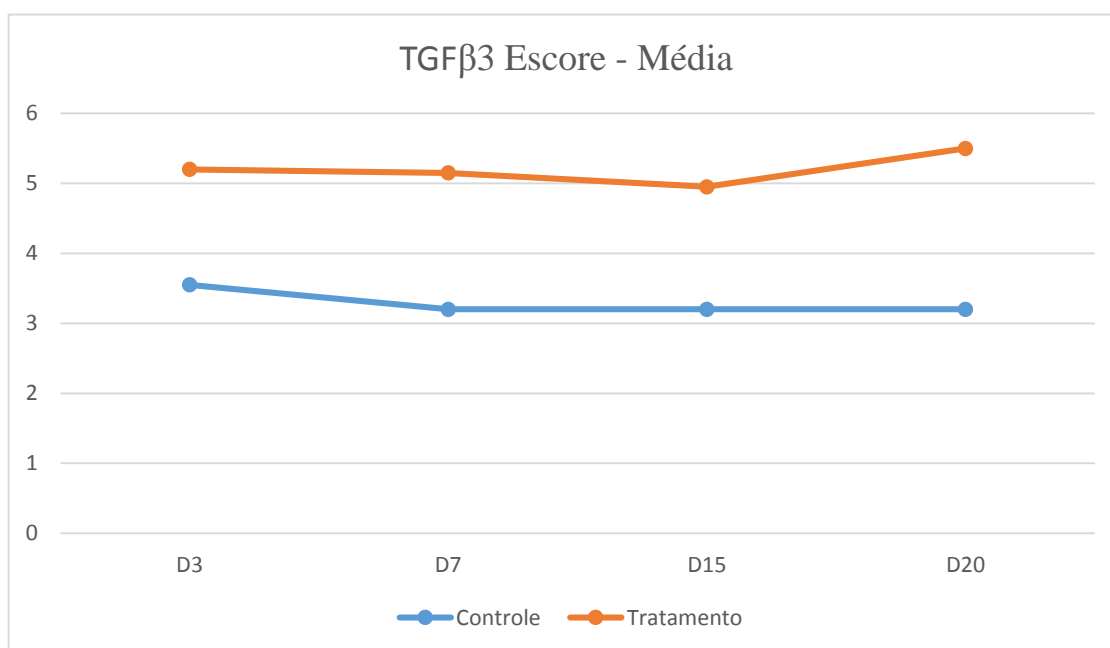


Gráfico 4 – Escore de TGF $\beta$ 3. A imunorreatividade para TGF $\beta$ 3 foi quantificada através de escore histológico para a imunoreatividade na epiderme e na derme. O somatório da reatividade epidérmica e dérmica representa o escore para TGF $\beta$ 3. Resultados demonstram a média do escore histológico para TGF $\beta$ 3 presente nos campos histológicos dos Grupos Tratado e Não Tratado nos diferentes tempos. Diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa em todos os tempos.



### 5.3.5 – Miofibroblastos

Os miofibroblastos são ausentes no 3º dia do processo da cicatrização. No sétimo dia, a quantidade é maior, estatisticamente significativa, no Grupo não Tratado, e praticamente desaparece no 15º dia. O Grupo Tratado apresentou menor quantidade de miofibroblastos no D7, com declínio no D15 (gráfico 5).

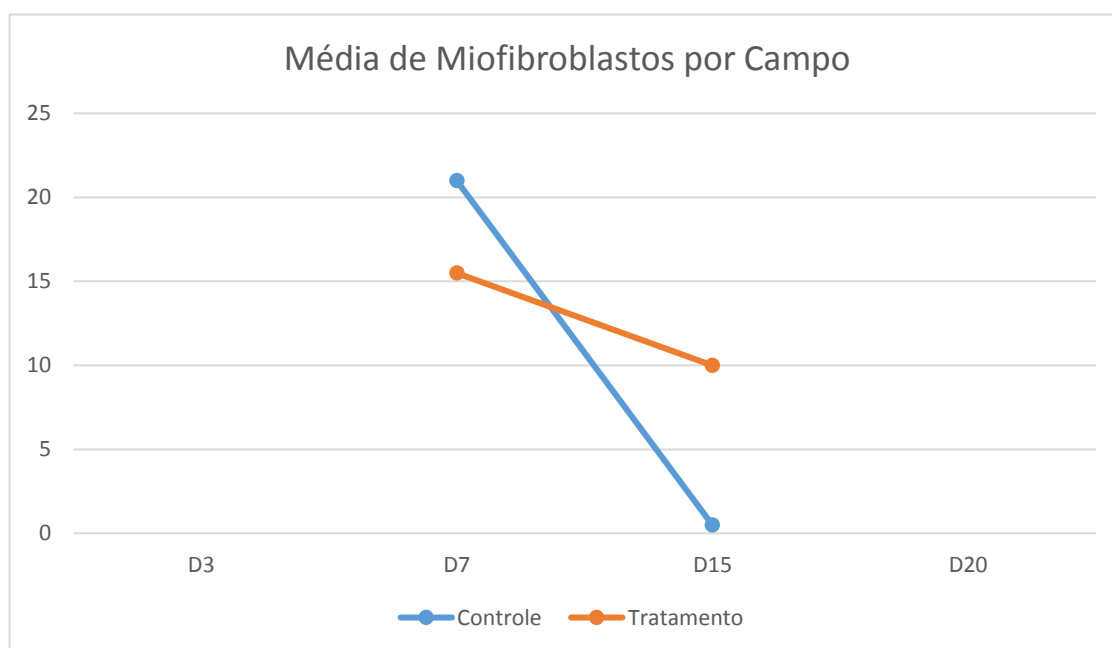


Gráfico 5 – Cinética de miofibroblastos durante a reparação da ferida dos Grupos Tratados e Não Tratados. Os miofibroblastos foram identificados pela sua imunoreatividade para a isoforma alfa do músculo liso em células não associadas aos capilares, com formato fusiforme. Resultados demonstram a média de miofibroblastos presentes nos campos histológicos de 40x (lente objetiva) nos diferentes tempos.

#### 5.4 - Ensaio Biomecânico

A média da resistência (momento da ruptura) atingida pela cicatrização do grupo experimento foi de 1.378g. o grupo controle foi de 1.054,66 g.

Comparando com a média do Grupo Não Manipulação, que foi de 2.335g, o Grupo Tratado atingiu 59% da resistência da pele normal, e o Grupo Não Tratado chegou a 45%. Comparando o Grupo Tratado com o Grupo Não Tratado, a média do Grupo Tratado foi 30% maior, estatisticamente significativa, com  $p < 0,05\%$  (tab. 3).

	<b>Grupo Tratado</b>	<b>Grupo Não Tratado</b>	<b>Grupo Não Manipulação</b>
Rato 1	1.295g	1.130g	2.346g
Rato 2	1.553g	852g	2.278g
Rato 3	1.278g	1.182g	2.381g
<b>Média</b>	<b>1.378g</b>	<b>1.054,66g</b>	<b>2.335g</b>

Tabela 4 – Ensaio biomecânico.

## 6 - DISCUSSÃO

Com a descoberta do processo de regeneração durante a vida fetal em humanos, e da capacidade de regeneração em escala ínfima presente em adultos, a cicatrização passou a ser questionada como a única forma da cura de feridas teciduais. A cicatrização fetal se tornou o modelo experimental nas pesquisas que visam desvendar os mecanismos da regeneração, a fim de diminuir a formação de cicatrizes e fibroses. Entretanto, esse modelo não é o ideal por se encontrar na fase de embriogenese, tendo uma mistura de “gênese” com “re-gênese”<sup>8,32</sup>. (Kazuo Kishi O processo de regeneração em adultos é encontrado em anfíbios e outros animais de escala inferior, não sendo também, ideal por se distanciar em demasia na escala evolutiva com os humanos. Todavia, em comum nesses dois modelos é a reação inflamatória atenuada<sup>6-11</sup>. Pesquisas sugerem que quanto maior e mais longa for a reação inflamatória, maior é formação de tecido de granulação e, a fibrose resultante. Por outro lado, quanto menor a inflamação, menor a fibroplasia<sup>6-11</sup>. Várias células e substâncias foram identificadas como inflamatórias e “fibróticas”, tais como a plaqueta, o mastócito, o macrófago presente na fase inicial do processo de reparação, com o fenótipo “clássico” ou o M1, que secretam citocinas, e fatores de crescimento, como o TNF- $\alpha$  etc<sup>32-38</sup>. Além dessas células, o miofibroblasto é visto, como o principal responsável pela fibrose e pela contratura cicatricial, quando produz excessivamente o colágeno e a força tensil<sup>5,39-43</sup>. Entretanto, as mesmas células podem apresentar efeitos contrários. O macrófago pode adquirir o fenótipo “alternativo” M2, e cessar a reação inflamatória e iniciar a remodelação do tecido<sup>35,36</sup>. Há evidências de que o mastócito, que está presente durante todo o processo da cicatrização, é necessário para finalizar o processo de cicatrização<sup>33,34</sup>. A matriz extracelular não é meramente um arcabouço. É uma estrutura bioativa, que interage com células, citocinas, fatores de crescimento, etc. guiam o crescimento e função celulares. E parece que o fibroblasto e o miofibroblasto durante o processo de fibrogenese, “tentam” recapitular a programação de regeneração. Essa suspeita é devida ao reaparecimento de proteínas embrionárias de matriz extracelular que induzem a resposta celular para construção de tecido funcional<sup>39-43</sup>. O processo de cicatrização é altamente complexo, de fino controle da interação no tempo e no

espaço, de células e substâncias ativas locais e sistêmicas com a MEC, o microambiente, e de ténue equilíbrio de síntese e degradação. Devido a plasticidade do organismo, o conceito do processo da cicatrização, ou melhor, o processo de reparação da ferida está em readaptação.

Várias células e substâncias foram estudadas na tentativa de assimilar uma reparação sem cicatriz, com resultados laboratoriais encorajadores. Porém, nenhum desses elementos foi traduzido com eficácia suficiente para o uso clínico.

A maioria dos produtos de uso clínico visam o crescimento do tecido de granulação e a sua contração para o fechamento mais rápido da ferida. Ou seja, são “pró-inflamatórios” e “pró-fibróticos”.

Os componentes naturais são largamente reconhecidos por sua ampla variedade de atividades farmacológicas. As pesquisas e aplicações clínicas tem aumentado de maneira significativa nos últimos tempos. O presente trabalho teve o intuito de verificar a influência da EcOA na tentativa de obter um tecido cicatricial mais funcional. A casca, a folha e a semente da *Carapa guianensis*, ou andiroba, sob forma de óleo ou emulsão, foram pesquisadas na cicatrização da pele e do trato gastrointestinal<sup>27</sup>, assim como testadas as suas propriedades antioxidante<sup>26</sup>, antialérgica, e, principalmente, anti-inflamatória.<sup>29</sup> Nas suturas colônicas e gástricas, os grupos tratados com andiroba apresentaram maior resistência a tensão ou pressão, e melhores cicatrizações.<sup>27,44</sup> No modelo de cicatrização de lesão cutânea por incisão, excisão e espaço morto, o tratamento causou re-epitelização mais rápida, maior produção de tecido de granulação e maior contração, com maior resistência do tecido cicatricial.<sup>45,46</sup> Nas periodontitis, ambiente altamente contaminado e de inflamação crônica, o tratamento com andiroba tem sido superior ao AINE (Meloxicar®), e promoveu a reparação, cessando a corrosão óssea alveolar.<sup>47</sup> A emulsão de óleo de andiroba tem sido utilizado no tratamento de queimaduras de 1º grau, escaras, na prevenção e tratamento de dermatite por radioterapias e por quimioterapias.<sup>17</sup>

No presente trabalho, o efeito da EcOA foi avaliado examinando algumas das principais células responsáveis pela inflamação, como o mastócito e o macrófago, a

célula que rege a fibroplasia, o miofibroblasto, e, uma das principais substâncias na cicatrização, o TGF $\beta$ .

Esperava-se uma cicatrização mais lenta com a atenuação da inflamação no Grupo Tratamento, entretanto, na macroscopia, a ferida que inicialmente parecia ser maior, a partir do 3º. dia, apresentou tecido de granulação mais exuberante e re-epitelização mais precoce, com diminuição mais expressiva da ferida, enquanto o grupo controle se encontrava com uma crosta sobre a ferida. E aparentemente, nos dias 15 e 20, a cicatriz parecia menor e de melhor aspecto no Grupo Tratado.

O Grupo Tratamento apresentou mastócitos em menor número, mas a diferença não é estatisticamente significativa. E teve comportamento semelhante, com aumento no 20º. dia no grupo controle. O mastócito é visto como pró-inflamatório, e está relacionado com cicatrização hipertrófica e queloidiana. A introdução exógena de mastócito durante a cicatrização fetal causou a formação de cicatriz em ratos. O bloqueio de mastócitos diminuiu a cicatriz em camundongos. Entretanto, o mastócito é uma célula difícil de estudar, não se conhece bem a sua função e a sua plasticidade. Atualmente, suspeita-se que o mastócito participa da remodelação e finalização da cicatrização<sup>33,34</sup>.

O macrófago é o principal regente da cicatrização. Presente em todo o processo da cicatrização adulta. Responde e sustenta a reação inflamatória, com função imunológica e secreção de citocinas e fatores de crescimento inflamatório, como TGF $\beta$ 1. Muda de fenótipo de M1 para M2, e faz a transição para a fase proliferativa, estimula a proliferação dos tecidos epitelial, endotelial e conectivo. Induz a formação da MEC, neovascularização e re-epitelização. O macrófago influencia direta e indiretamente a fase de fibroplasia e remodelação, e está relacionado com cicatrização hipertrófica<sup>35,36</sup>. Encontra-se ausente na cicatrização fetal. No terceiro dia, o macrófago está em maior número no Grupo Tratamento, e subsequentemente diminui nos dias 7 e 15, e torna a aumentar discretamente no vigésimo dia. Talvez a re-epitelização e a formação de tecido de granulação mais exuberante seja o efeito do macrófago mais numeroso no início, e a escassez de miofibroblasto seja consequência da queda do macrófago no 7º e 15º dia. O Grupo Não Tratado apresentou aumento de macrófagos no sétimo dia, quase se sustenta

até o dia 15 e diminui no 20º dia. Pode ser a causa do aumento de miofibroblastos no 7º dia nesse grupo.

Na cicatrização fetal é característica a ausência ou atenuação da inflamação com diminuição de fatores solúveis pró-inflamatórios e aumento de anti-inflamatórios, diminuição da vascularização, e ausência de miofibroblastos<sup>2,5,6</sup>. Entretanto, essas características não podem ser totalmente transportadas para a cicatrização adulta. O camundongo espinhoso africano (*Acomys*)<sup>8</sup>, descoberto recentemente, cura a ferida sem a formação de tecido cicatricial, na vida adulta. O seu processo de regeneração é semelhante, mas não idêntica ao processo de regeneração fetal, tendo algumas características inflamatórias.<sup>8</sup> Comparando a expressão genética e clínica da cicatrização fetal (sem cicatriz) com a da mucosa oral de adulto, que cicatriza com o mínimo de cicatriz, com a cicatrização normal do adulto (com cicatriz), e, com a cicatrização crônica senescente (não cicatrização), a cicatrização fetal apresenta maior resistência tensil da pele regenerada, maior taxa de proliferação, migração celular, deposição da MEC e remodelação, maior resposta aos fatores de crescimento, maior taxa de re-epitelização, e, menor angiogênese, menos inflamação, e menor tempo de cicatrização. A cicatrização senil ou crônica, apresenta todos os parâmetros diametralmente opostos, salvo a vascularização que também é escassa. A cicatrização adulta é uma mistura das características fetais com a senil, um “meio-termo”, com exceção da vascularização, que se encontra mais aumentada. As características da cicatrização da mucosa oral estão entre a da fetal e a do adulto. O fibroblasto da mucosa oral possui fortes características fetais. O microambiente da cicatrização fetal é caracteristicamente hipóxico, apesar da taxa de metabolismo mais alta<sup>38</sup>. Mesmo com a diminuição de macrófagos e de miofibroblastos, e, do aumento do TGFβ3, o Grupo Tratado apresentou neovascularização aumentada, com ápice no 15º dia, e decresce até o 20º dia, mas mantendo-se maior que o Grupo Não Tratado. Acredita-se que neovascularização passageira da cicatrização é proporcional a intensidade da inflamação, e o relevante é a vascularização permanente resultante<sup>1</sup>. O aumento da vascularização no Grupo Tratado pode ser reflexo do aumento de metabolismo, e não resposta a inflamação.

O TGFβ3 é um dos principais agentes anti-inflamatórios e anti-fibróticos na cicatrização<sup>37,38</sup>. Está aumentada na cicatrização fetal e diminuída na do adulto.<sup>37,38</sup>

Encontra-se aumentado no Grupo Tratado desde o início do processo, na fase inflamatória, mantém-se estável, e aumenta discretamente no 20º dia, nas fases proliferativa e remodeladora. Esse nível elevado e sustentado de TGF $\beta$ 3 nesse grupo está de acordo com o comportamento do macrófago (diminuído), do miofibroblasto (diminuído), e com a cicatrização resultante, ou seja, menos tecido cicatricial com maior resistência mecânica.

O fibroblasto e o miofibroblasto são principais células na proliferação, contração e remodelação da cicatrização. O aumento do miofibroblasto também relacionado com aumento da formação de fibrose na cicatrização adulta, e, não há miofibroblastos na cicatrização fetal. O miofibroblasto só apareceu no 7º dia em ambos grupos, e em maior quantidade no Grupo Não Tratado, e quase desaparece no 15º dia. O Grupo Tratado apresentou número menor de miofibroblastos no sétimo dia, e diminuiu de forma gradual até 15º dia. Talvez a menor cicatriz resultante do Grupo Tratado seja reflexo dos miofibroblastos em menor número, e a sua permanência por um tempo um pouco mais prolongado.

A resistência do tecido cicatricial resultante do Grupo Tratado foi 30% acima do Grupo Não Tratado, provavelmente, devido a maior teor de colágeno I no tecido cicatricial no Grupo Tratado.

A aplicação da EcOA na ferida cutânea aberta de espessura total em ratos, imediatamente após a lesão, provavelmente teve efeito de na fase da inflamação do processo de cicatrização, com conseqüente modulação das fases subseqüentes de proliferação e remodelação.

## **7 - CONCLUSÃO**

O tratamento da ferida cutânea aberta de espessura total em ratos com a EcOA modulou o processo de reparação da ferida com conseqüente melhor funcionalidade do tecido cicatricial.



## 8 - REFERENCIA

1. Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 514-25.
2. Janis JE, Harrison B. wound healing: part I. Basic science. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133(2): 199e-207e.
3. Lo DD, Zimmermann AS, Nauta A, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal skin wound healing update. *Birth Defect Research.* (part C) 2012, 96: 237-47.
4. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic Translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18(7): 1028-40.
5. Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000Biology Reports.* 2010; 2:78-82
6. Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic Science review. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126(4): 1172-80.
7. Bellary IH, Walters TJ, Li Y. Scarless wound healing. *J Am Col Certif Wound Specialists.* 2010, 2: 40-3.
8. Brant JO, Lopes M-C, Baker HV, Barbazuk WB, Maden M. Comparative Analysis of Gene Expression Profiles during Skin Regeneration in Mus and Acomys. *Plos ONE.* 2015; 10(11): e0142931.
9. Rolfe KJ, Grobelaar AO. A review of fetal scarless healing. *Int Scholarly Research Network.* *ISRN Dermatol.* 2012: article ID698034.
10. Wulff BC, Yu I, Parent AE, Wilgus TA. Novel differences in the expression of inflammation-associated genes between mid- and late-gestational dermal fibroblasts. *Wound Rep Reg.* 2013; 21:103-112.
11. Satish L, Kathiu S, Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. *Dermatol Res Praticce.* 2010, article ID 790234, 11 pages.

12. Monument MJ, Hart DA, Salo PT, Befus AD, Hildebrand KA. Neuroinflammatory mechanisms of connective tissue fibrosis: targeting neurogenic and mast cell contributions. *Advances Wound Care*. 2015; 4(3): 137-51
13. Albert LR, Vasconcellos LS, Petroianu A. Influence of local or systemic corticosteroids on skin wound healing resistance. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(4): 295-9.
14. Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV. Do nonsteroidal anti-inflammatory drug affect bone healing? A critical analysis. *The Scientific Journal*. 2012; article ID 606404.
15. Cela EVSS, Rocha MB, Gomes TM, Chang YC, Alves CF. Avaliação clínica da eficácia do óleo de andiroba na queimadura pós-depilação com luz intensa pulsada: estudo prospectivo, comparativo e duplo-cego. *Surg Cosmet Dermatol*. 2012; 4(3): 248-51.
16. Cela EVSS, Rocha MB, Chang YC, Alves CF. Tratamento da queimadura de primeiro grau com emulsão de óleo de andiroba: estudo prospectivo, comparativo e duplo-cego. *Surg Cosmet Dermatol*. 2014; 6(1): 44-9.
17. Kumar et al: Robbins & Cotran Pathological Basis of Disease, 8<sup>th</sup> Edition, 2009, Saunders, Elsevier, Inc.
18. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 2059-81.
19. White ES, Mantovani AR. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *J Pathol*. 2013; 229: 141-4.
20. King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. Regenerative wound healing: the role of interleukin-10. *Advance Wound Care*. 2014; 3(4): 315-23

21. King A, Balaji S, Le LD, Crombleholm TM, Keswani SG. Interleukin-10 regulates fetal extracellular matrix hyaluronan production. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(6): 1211-7
22. Kishi K, Okabe K, Shimizu R, Kubota Y. Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: Complete regeneration of skin. *Keio J Med*. 2012; 61(4): 101-108.
23. Fisch STV, Ferraz IDK, Rodrigues WA. Distinguishing *Carapa guianensis* Aubl. from *Carapa procera* D.C.(Meliaceae) by morphology of young seedlings. *Acta Amaz*. 1995; 25:193-200.
24. Bauch J, Dunisch O. Comparison of growth dynamics and wood characteristics of plantation grown and primary forest *Carapa guianensis* in central Amazonia. *IAWA J*. 2000; 21:321-333.
25. Miranda Júnior RN, Dolabela MF, da Silva MN, Póvoa MM, Maia JG. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *J Ethnopharmacol*. 2012; 142(3):679-83.
26. Milhomem-Paixão SS, Fascineli ML, Roll MM, Longo JP2, Azevedo RB, Pieczarka JC, Salgado HL, Santos AS, Grisolia CK. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol*. 2016; 39(2):248-56.
27. Santos OJ, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Czczko NG, Santos RH, Santos RA. Influence of *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) and *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) in the healing process of gastrorrhaphies. *Arq Bras Cir Dig*. 2013; 26(2):84-91.
28. Miot HA, Batistella RF, Batista KA, Volpato DEC, Augusto LST, Madeira NG, Haddad-Junior V, Miot LDB. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004; 46:253-256.

29. Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S., Rodrigues, C.A., Pereira, J.F., Henriques, M.G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res.*, 2006 Nov; 55(11): 457-64.
30. da Silva, V.P., Oliveira, R.R., Figueiredo, M.R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochem Anal.*, 2009 Jan; 20(1): 77-81.
31. Garg VK, Paliwal SK. Wound-healing activity of ethanolic and aqueous extracts of *Ficus benghalensis*. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011; 2: 110-114.
32. Peak MA, Caley M, Giles PJ, Wall I, Enoch S, Davies LC, Kipling D, Thomas DW, Stephens P. Identification of a transcriptional signature for the wound healing continuum. *Wound Rep Reg.* 2014; 22: 399-405.
33. Wulff BC, Parent AE, Melesk MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(2): 458-65
34. Chen L, Schrementi ME, Ranzer MJ, Wilgus TA, DiPietro LA. Blockade of mast cell activation reduces scar formation. *PLoS ONE.* 2014; 9(1): e85226.
35. Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek. Disclosure of the culprits: macrophages – versatile regulator of wound healing. *Advances Wound Care.* 2013; 2(7): 357-
36. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011; 216: 753-62.
37. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF $\beta$  Family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma.* 2012; 2(1): 18.
38. Finson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. *Advances Wound Care,* 2013; 2(5): 195-

- 39.Hinz B, Phan SH, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent development in myofibroblast biology paradigm for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012; 180(4):1340-
- 40.Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J Biomechanics.* 2010; 43: 146-55.
- 41.Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 526-37.
- 42.Wipff PJ, Rifkin DB, MeisterJJ, Hinz B, Myofibroblast contraction activates latente  $\text{tgf-}\beta 1$  from the extracellularmatrix. *J Cell Biology.* 2007; 179(6): 1311-23.
- 43.Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implication for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* 2013; 229(2): 298-309.
- 44.Silva CES, Santos OJ, Ribas-Filho JM, Tabushi FI, Kume MH, Jukonis LB, Cella IF. Efeito da *Carapa guianensis Aublet* (Andiroba) e *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização de colorrafias em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2015; 42(6): 399-406.
- 45.Nayak BS, Kanhai J, Milne DM, Swanston WH, Mayers S, Eversley M, Rao AVC. Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis L.* (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models. *J Med Food.* 2010; 13(5): 1141-6.
- 46.Nayak BS, Kanhai J, Milne DM, Pereira LPSwanston WH. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis L.* leaf fir its wound healing activity using three wound models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011; ID 419612.
- 47.Carmona GB, Teixeira RKC, Brito MVH, Pontes FSC, Andrade HA, Fonseca FP, Costa RMB, Carvalho FM. Effect of andiroba oil on periodontitis in Wistar rats. *Act Cir Bras.* 2013; 28(6): 430- 4