



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
Av. Pará, 1720 Bloco 2B, Sala 254 - “Campus Umuarama”
Uberlândia - MG - Tel.(034)3218 2240 CEP: 38.400-902

Natália Lopes Viana

**Efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* na inflamação crônica induzida por
implantes sintéticos em camundongos**

Uberlândia
Abril - 2016

Natália Lopes Viana

Efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* na inflamação crônica induzida por implantes sintéticos em camundongos

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Tatiana Carla Tomiosso

Coorientadora: Dr^a. Fernanda de Assis Araújo

Uberlândia
Abril - 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

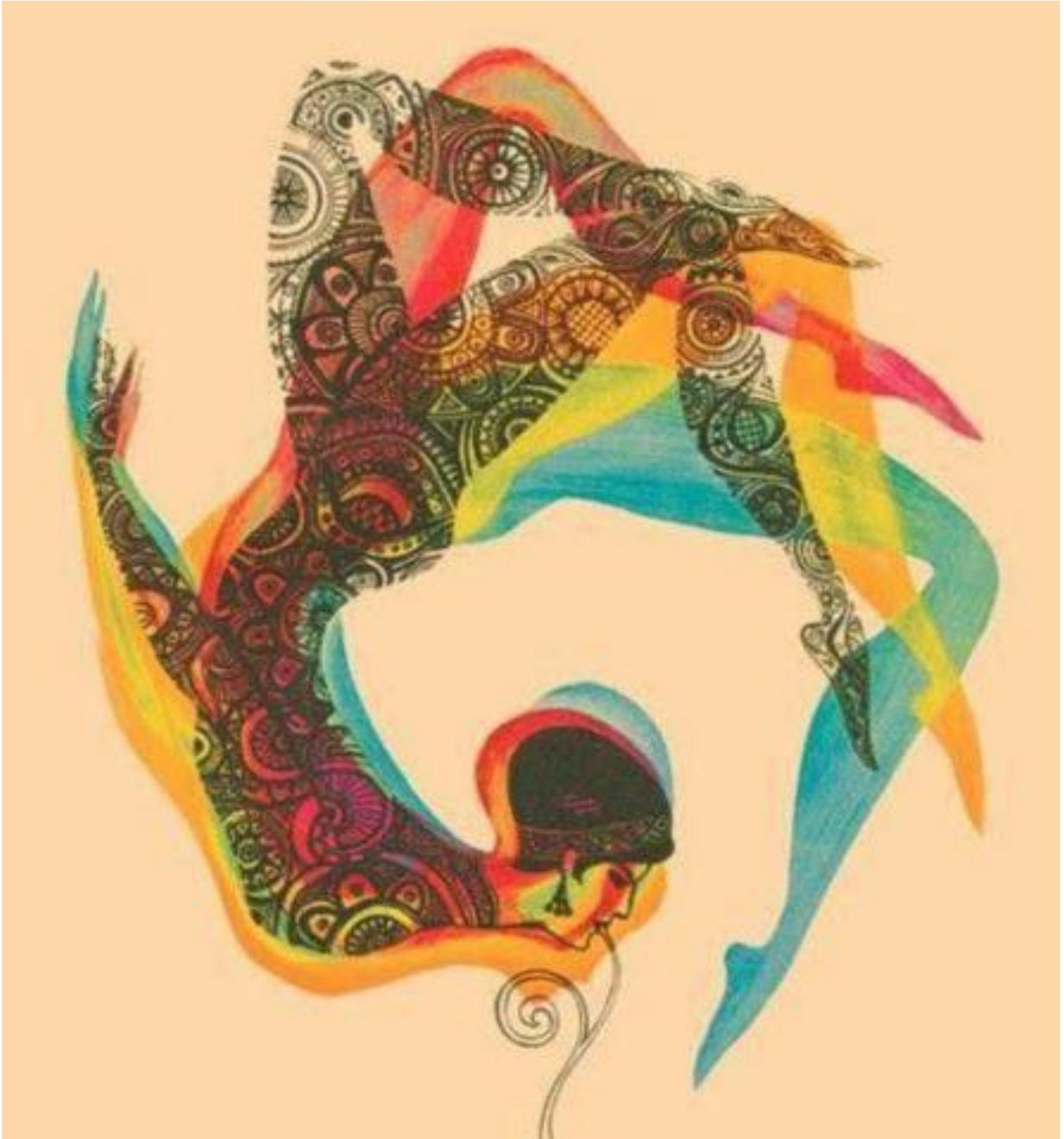
V614e Viana, Natália Lopes, 1981
2016 Efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* na inflamação crônica induzida por implantes sintéticos em camundongos / Natália Lopes Viana. - 2016.
77 f. : il.

Orientadora: Tatiana Carla Tomiosso.
Coorientadora: Fernanda de Assis Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Agentes antiinflamatórios - Teses. I. Tomiosso, Tatiana Carla. II. Araújo, Fernanda de Assis. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Dedico este trabalho ao meu pai “*in
memoriam*”, o grande impulsionador do meu
desenvolvimento acadêmico.



*“Você é o que repetidamente faz.
Excelência não é um evento, é um hábito.” (Aristóteles)*

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças á colaboração e contribuição, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, laboratórios e instituições, aos quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento.

- Agradeço infinitamente a minha querida orientadora: Prof. Dr^a. Tatiana Carla Tomiosso por me receber como aluna de mestrado; por depositar em mim a confiança na realização deste trabalho. Além disso, agradeço pela delicadeza e gentileza ao tratar dos mais variados assuntos, sejam acadêmicos e profissionais ou sejam pessoais. Obrigada pela amizade e respeito conquistados ao longo destes dois anos, por compartilhar seus conhecimentos científicos que foram fundamentais para o meu desenvolvimento e formação acadêmica e, por fim, por ser meu espelho, e nele refletir tanto conhecimento, simplicidade, perseverança e amor pela pesquisa.
- À Prof. Dr^a. Fernanda de Assis Araújo, pela disponibilidade manifestada em coorientar este trabalho; pelos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões; pela cordialidade e simpatia demonstradas no desenvolvimento desta pesquisa.
- Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas e aos brilhantes professores que dele fazem parte. Obrigada por serem tão pacientes nas aulas, pela dedicação e disposição em nos ensinar.
- Aos técnicos dos laboratórios e funcionários vinculados ao Instituto de Ciências Biomédicas, obrigada pelo atendimento, cordialidade, ajuda e dedicação aos alunos da pós-graduação.
- Ao Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago da UNIFESP por ceder o extrato de *Casearia sylvestris*, elemento chave para realização deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro necessário ao desenvolvimento desta pesquisa científica.

- A todos os amigos da pós-graduação, em especial Ariadne, Flávia, Glenda, Maurília, Sarinha e Talita por serem tão carinhosas comigo ao longo desses dois anos; pela cumplicidade, por torcerem por mim na hora das apresentações de seminários (ufa!!); por me ouvirem nos momentos tristes e pelas boas e longas conversas.
- Aos meus amigos de laboratório... Nossa! Quanta coisa (não é?), Anderson, Bruno, Francielle, Ricardo e Simone. Uma turma alto-astrol com quem compartilhei momentos que vão além de uma bancada de laboratório: quantos experimentos (que deram certo e que também deram errado), quanto sufoco, quantas risadas, quantos espetinhos e quantos 'bar do André'! Com essas pessoas percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é a amizade.
- Não posso deixar de falar das minhas 'rommate friends' Gi e Jujuba que dividiram, por muito tempo, o mesmo teto comigo. Obrigada por serem tão pacientes, amáveis e compreensivas; pelas risadas, pelas cachoeiras, pelas partidas de candy crush e pela amizade que construímos.
- Agradeço a minha mãe e minhas irmãs (Nataly e Priscila) pelo incentivo, apoio e pela torcida pra que tudo desse certo.
- Às minhas sobrinhas, Alice e Mel, que apesar de tão pequeninas e nem saberem falar, fizeram parte dos meus pensamentos durante os últimos dois anos, trazendo felicidade e forças pra eu continuar lutando.
- Por fim, agradeço ao meu pai, Sr. Romero Viana, pelo seu apoio, por tudo que me deu e me ensinou. Obrigada pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Não encontro palavras que consigam agradecer, simplesmente me vejo envolvida por um enorme sentimento de gratidão. Muito obrigada, pai!

RESUMO

No presente trabalho foi realizado um estudo para avaliação do processo inflamatório crônico usando o extrato de *Casearia sylvestris*: uma espécie de planta popularmente conhecida por seu efeito anti-inflamatório. A eficácia desta planta foi avaliada na resposta inflamatória crônica induzida por implantes sintéticos em camundongos. Para este propósito, foram utilizados 60 camundongos, C57/B1/6, machos, com 8 semanas de vida, divididos em 5 grupos: (1) controle (salina), (2) controle (DMSO1%), (3) tratado com doses de 10ng do óleo essencial extraído da *Casearia sylvestris*, (4) tratado com doses de 100ng deste óleo e (5) tratado com doses de 1000ng do mesmo óleo. Os animais foram submetidos a uma resposta inflamatória crônica, induzida pelo implante sintético e tratados diariamente com estas doses nos tempos 0-8dias. Após 9 dias de tratamento, o implante foi removido e submetido a análises bioquímicas e histológicas onde avaliou-se o componente inflamatório pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), que corresponde à enzima presente em neutrófilos, da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos e pela análise quantitativa de mastócitos presentes no tecido fibrovascular. Por sua vez, avaliou-se o componente angiogênico pelo conteúdo de hemoglobina, bem como pela quantificação de vasos sanguíneos. Por último, a fase de reparo foi avaliada pela quantificação de colágeno solúvel e também por meio da quantificação de colágenos do tipo I e III depositados no tecido fibrovascular. Os experimentos que analisaram o efeito da *Casearia sylvestris* revelaram que apesar de a ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris* ser difundida e evidenciada pela medicina popular, as doses utilizadas no presente trabalho via injeção local, sob o modelo de inflamação crônica, induzida por implante sintético não apresentaram alterações significativas sobre os componentes avaliados em nenhum dos tratamentos utilizados comparação com o grupo controle salina, e, portanto, não exibiu efeitos anti-inflamatórios na inflamação crônica. Contudo, nós acreditamos que a presente pesquisa contribui cientificamente na compreensão da atividade do extrato bruto de *Casearia sylvestris* e sugere que o extrato da planta seja investigado em outras formas de administração. Além disso, sugere-se que as dosagens sejam avaliadas em outras concentrações de modo que as mesmas sejam ajustadas adequadamente para avaliação do processo.

Palavras chave: Inflamação crônica, *Casearia sylvestris*, reparo tecidual

ABSTRACT

In this work a study was conducted to evaluate the chronic inflammatory process using *Casearia sylvestris* extract: a species of plant popularly known for its anti-inflammatory effect. The effectiveness of this plant was evaluated into a chronic inflammation process induced by a synthetic matrix implanted in mice. It has been analysed by the inflammatory component, the angiogenic component and the tissue repair phase. For this purpose, 61 male mice C57/B1/6, 8 weeks old were divided into 5 groups: (1) control (saline), (2) control (DMSO1%), (3) treated with 10ng of *Casearia sylvestris* essential oil, (4) treated with 100ng of this oil and (5) treated with 1000ng from the same oil. The animals underwent to a chronic inflammatory response induced by synthetic sponge and treated everyday with these dosages per 9 days. The results have shown that the inflammatory component, represented by the evaluation of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glicosaminidase (NAG) activity and number of mast cells had no significant difference between the three doses evaluated compared to the control group. Furthermore, the angiogenic component also showed no statistic difference in the levels of hemoglobin, not even on vessels quantification. About the tissue repair, there were no changes in soluble collagen content also not for also quantification of collagen type I and III deposition. According to the results, the chronic inflammation treated with *Casearia sylvestris* essential oil had no effect on inflammatory process. The experiments that analyzed the effect of *Casearia sylvestris* revealed that although the anti-inflammatory action of *Casearia sylvestris* be widespread and evidenced by popular medicine, the doses used in this work via local injection under the chronic inflammation model induced by synthetic implant, showed no significant changes of the components evaluated in any of the treatments compared with the saline control group, and therefore exhibited no anti-inflammatory effects in chronic inflammation. However, we believe that this research contributes in understanding the scientific activity of the crude extract of *Casearia sylvestris* and suggests that the plant extract to be investigated in other forms of administration. Furthermore, it is suggested that the measurements are evaluated in other concentrations, so that they are properly adjusted for process evaluation.

Key words: Chronic inflammation, *Casearia sylvestris*, tissue repair

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2/MCP-1 - Quimiocina CC ligante 2/ Proteína quimiotática para o monócito -1 (MCP-1)

CO - Grupo controle

CXC - Grupo de quimiocinas com uma cisteína entre os dois resíduos amino-terminais

CXCL-1/KC - Quimiocina motivo CXC ligante / Quimiocina derivada de queratinócito

dH₂O - Água destilada

DMSO - Dimetilsufóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-linked ImmunoSobernt Assay*

EPM - Erro padrão da media

FAK - Quinase de adesão focal (Focal adhesion kinase)

FGF - Fator de crescimento fibroblástico

g - Gramas

H₂O₂ - Peroxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

Hb - Hemoglobina

H.E. - Hematoxilina e Eosina

HTAB - Hexadecil trimetil brometo de amônio

ICAM - Membro da superfamília das imunoglobulinas

IL - Interleucina

Kg - Kilograma

MEC - Matriz extracelular

Mili-Q H2O - Água ultrapura
mL - Mililitros
mM - Milimolar
MMP - Metaloproteinase de matriz
MPO - Mieloperoxidase
NaCl - Cloreto de sódio
NAG - N-acetil- β -D-glicosaminidase
Na3PO4 - Fosfato de sódio
NO - Óxido Nítrico
ng - nanograma
nM - NanoMolar
nm - NanoMetro
O.D - Densidade óptica
r.p.m - - Rotações por minuto
TGF- β - Fator de transformação do crescimento *beta*
TNF- α - Fator de necrose tumoral *alfa*
Tris - Tris-(hidroximetil) aminometano
 μ g - Microgramas
 μ m - Micrometros
VEGF - Fator de crescimento do endotélio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação gráfica das fases do reparo.
- Figura 2:** Esquema representativo dos sinais cardinais característicos da inflamação.
- Figura 3:** Componentes da resposta inflamatória e suas principais funções.
- Figura 4:** Principais manifestações vasculares no local da inflamação.
- Figura 5:** Principais manifestações vasculares e celulares no local da inflamação.
- Figura 6:** Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. Diapedese.
- Figura 7:** Esquema da formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes
- Figura 8:** Representação esquemática da angiogênese.
- Figura 9:** Resultado da inflamação: cura por cicatrização ou cicatrização com formação de matriz fibrótica.
- Figura 10:** Árvore de *Casearia sylvestris* Swart.
- Figura 12:** Matriz sintética de poliéster-poliuretano.
- Figura 13:** Participação mundial em artigos sobre o gênero *Casearia*, publicados na *Web of Science*.
- Figura 14:** Número de publicações por país do gênero *Casearia* do período de 1973 a 2012 na base de dados da *Web of Science*.
- Figura 15:** Grupo experimental “n” total igual a 60 animais.
- Figura 16:** Preparo das doses a partir da solução mãe de *C.sylvestris*.
- Figura 17:** Implante do disco de esponja.
- Figura 18:** Tratamento: 10µL da dose, administrada intrainplantar.
- Figura 19:** Remoção do implante dotado de material fibrovascular.
- Figura 20:** Ensaio bioquímico e histológico.
- Figura 21:** Representação ilustrativa das secções na esponja para testes bioquímicos.
- Figura 22:** Corte histológico (5µm, coloração azul de toluidina).
- Figura 23:** Corte histológico (5µm, coloração tricrômico de gômori).
- Figura 24:** Corte histológico (5µm, coloração Picrosirius Red).
- Tabela 1:** Participação dos mediadores nas diferentes etapas do processo de Cicatrização
- Tabela 2:** Características da inflamação aguda e crônica.
- Tabela 3:** Uso popular da *Casearia sylvestris* em alguns países

Sumário

1 - Introdução.....	13
2 - Reparo tecidual.....	15
3 - Inflamação crônica	30
4 - <i>Casearia sylvestris</i>	33
5 - Matriz sintética e o estudo sobre o componente fibrovascular.	37
6 - Objetivos	38
7 - Justificativa	39
8 - Materiais e métodos	42
9 - Resultados	53
9.1 - Efeitos do tratamento no componente inflamatório	54
9.2 - Efeitos do tratamento no componente angiogênico	57
9.3 - Efeitos do tratamento no reparo tecidual.....	60
10 - Discussão.....	63
11 – Conclusão	68

1 - Introdução

A inflamação é uma resposta natural e essencial proporcionada pelo sistema imune para assegurar a sobrevivência do tecido mediante a uma injúria tecidual causada por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas, promovendo a remoção do estímulo nocivo e a recuperação do tecido danificado (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2015; AHMED, 2011, LIMA *et al.*, 2007). Tal reparação tecidual é impulsionada por um mecanismo endógeno, complexo e equilibrado o qual é ativado por eventos ordenados e bem distintos consistindo em 4 etapas, que ocorrem de forma sobrepostas e integradas: hemostasia, inflamação, proliferação (também conhecida como replicação e estágio de síntese) e remodelação (SHAH *et al.*, 2012; WATSON, 2012; GUO & DIPIETRO, 2010).

Os principais componentes da inflamação são a reação vascular e a resposta celular, ambas ativadas por mediadores químicos derivados de proteínas plasmáticas e de várias células. A ocorrência desses eventos é responsável pelas manifestações externas da inflamação, chamadas de sinais cardinais: calor, rubor, dor, inchaço e perda funcional do tecido (KUMAR *et al.*, 2013).

Para a maioria dos pacientes, a recuperação do tecido lesionado ocorre naturalmente, sem a necessidade de medicamentos, terapia ou outras intervenções (WATSON, 2012). Vale ressaltar que muitos fenômenos de reparo acontecem em nosso organismo sem que percebamos sua ocorrência (CONSOLARO, 2009). Entretanto, numa inflamação extensiva, prolongada ou não regulada onde o agente agressor não é removido, o processo inflamatório progride para uma inflamação crônica podendo ser altamente prejudicial ao organismo, pois os mecanismos desenvolvidos para destruir agentes invasores e tecido necrótico têm a capacidade de lesar o tecido normal. Quando a inflamação é direcionada inadequadamente para os próprios tecidos ou não é eficientemente controlada, ela se torna causa de lesão e de doença (LIMA *et al.*, 2007). Muitas doenças envolvem inflamação crônica e representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil (DUNCAN *et al.*, 2012). Estas doenças podem ser a causa de dano tecidual como ocorre na esclerose múltipla, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doenças cardiovasculares, câncer, doença respiratória crônica e diabetes (DUNCAN *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2007). Com isso,

uma intervenção terapêutica torna-se necessária, de modo que seja capaz de controlar a intensidade da inflamação reduzindo o risco de lesão tecidual, mas sem interferir em seus efeitos benéficos (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998). Desta forma compreende-se a busca pela possibilidade de facilitar ou promover a normalidade da reparação tecidual por intermédio da otimização dos eventos envolvidos na inflamação (WATSON, 2012).

Estudos sobre a medicina popular vêm merecendo atenção cada vez maior devido ao contingente de informações e esclarecimentos que fornecem à Ciência. No cotidiano das práticas de saúde, a aplicação de princípios científicos desencadeou a descoberta de terapêuticas que melhoraram a qualidade de vida das pessoas (DE FRANÇA *et al.*, 2007). No ocidente, o consumo de plantas medicinais vem aumentando substancialmente, no qual, cerca de 40% da população utiliza regularmente plantas medicinais e preparações fitoterápicas sob o rótulo de serem produtos inócuos ou seguros. Porém, na maioria das vezes, não há comprovação científica de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (ARAÚJO *et al.*, 2015).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), divulgada em 2009 pelo Ministério da Saúde, apresentou 71 plantas que podem subsidiar a elaboração de fitoterápicos para uso da população na assistência farmacêutica do SUS (Marques *et al.*, 2013). Dentre essas espécies com potencial terapêutico, encontra-se a *Casearia sylvestris*, cujo valor medicinal dos seus extratos e compostos isolados é ressaltado pelo seu potencial farmacológico popularmente conhecido (FERREIRA *et al.*, 2011). Na medicina popular, a decocção da folha da *Casearia sylvestris* é preparada tanto para uso oral, quanto para aplicação tópica (SASSIOTO *et al.*, 2004) aplicadas ao tratamento de aftas, herpes simples, úlceras gástricas, picadas de insetos, tratamento tópico de feridas, queimaduras, erupções cutâneas, eczema e vitiligo. São também utilizadas como cicatrizantes, antisséptica, antimicrobiana, hemostática, depurativa do sangue e anti-inflamatória (MARQUES *et al.*, 2013; LIPINSKI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2011; CAPOBIANGO *et al.*, 2009; DA SILVA, 2004).

Para melhor elucidação científica da atividade anti-inflamatória descrita na medicina popular sobre a *Casearia sylvestris*, o presente trabalho tem por objetivo avaliar ensaios, *in vivo*, dos efeitos do óleo essencial de *Casearia sylvestris* no processo inflamatório crônico, por meio de avaliações das alterações bioquímicas e morfológicas envolvidas neste processo.

2 - Reparo tecidual

O reparo tecidual refere-se à restauração da arquitetura e função tecidual após a lesão, onde ocorrerá a substituição do tecido danificado por um tecido vivo (ABBAS, *et al.*, 2008). É um complexo processo biológico regulado essencialmente por várias células inflamatórias que se acumulam no interior do compartimento da lesão (CAMPOS *et al.*, 2006). A sequência de eventos requer um alto grau de coordenação e regulação dos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios.

O reparo é composto por dois processos essenciais: regeneração e cicatrização. A diferença entre os dois é baseada no tecido resultante (ABBAS, *et al.*, 2008). Na regeneração, o tecido é remodelado pela proliferação de células especializadas adjacentes (WATSON, 2012). Neste processo, os tecidos são capazes de restituir os componentes lesados e retornarem ao seu estado normal, ou seja, com as mesmas características funcionais e morfológicas do tecido original (ABBAS, *et al.*, 2008). Em cicatrização, o tecido lesado é substituído por tecido de granulação, que amadurece para formar tecido cicatricial ou cicatriz (WATSON 2012), e este tecido cicatricial é incapaz de se reconstituir completamente (ABBAS, *et al.*, 2008).

Os processos envolvidos na reparação tecidual não são simples de serem descritos e não é possível distinguir o começo ou o fim de cada um deles (COUTO *et al.*, 2015). A maneira mais simples e didática de descrever o processo de cicatrização é dividi-lo em grandes etapas que ocorrem de formas sobrepostas e integradas (COUTO *et al.*, 2015; WATSON 2012). Fica claro que, para alguns pesquisadores, a descrição dos eventos de reparação é baseada em 3 etapas (inflamação, proliferação e reparação), diferentemente de Watson, (2012), que as aloca em 4 fases, sendo estas: hemostasia, inflamação, proliferação (também conhecida como replicação e estágio de síntese) e remodelação (SHAH *et al.*, 2012; GUO & DIPIETRO, 2010). Embora seja um processo contínuo, suas fases sobrepõem-se durante todo o período (CAMPOS *et al.*, 2006) (Figura 1). O resultado final da combinação desses eventos é a reparação do tecido danificado com a formação de uma cicatriz cuja qualidade estrutural, estética e funcional não é equivalente as do tecido original (WATSON, 2012).

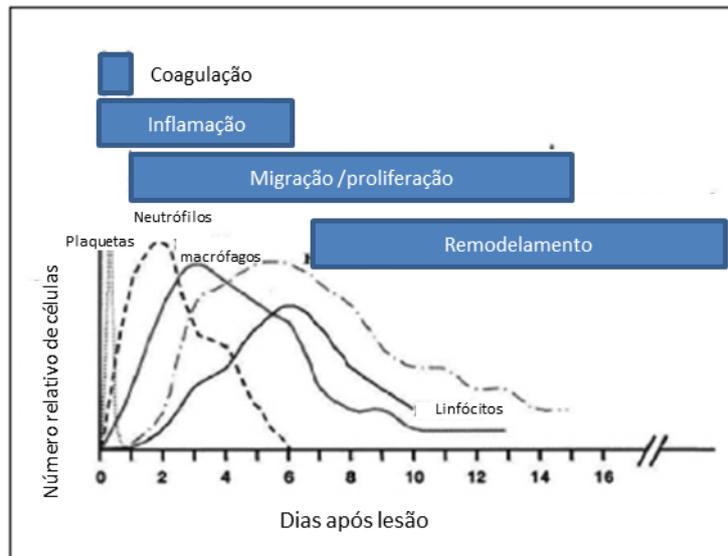


Figura 1: Representação gráfica das fases do reparo. Extraído e adaptado de: De Mendonça, (2009).

2.1 - Hemostasia

A primeira etapa do reparo tecidual é conhecida como hemostasia e ocorre imediatamente após a lesão (OLCZYK, 2014). Sua finalidade é formar um tampão hemostático e parar a hemorragia (AHMED, 2011). Ela é iniciada por plaquetas ativas que se submetem à adesão, agregação e ativação como uma consequência do seu contato com componentes da MEC (LOPES, 1999). Uma vez ativadas, as plaquetas liberam glicoproteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, trombospondina (COUTO *et al.*, 2015) e fator de von Willebrand) que, além de serem importantes constituintes da matriz extracelular provisória, reforçam ainda mais a agregação plaquetária (ISAAC *et al.*, 2010). A superfície das plaquetas ativadas torna-se, simultaneamente, o sítio de ativação da protrombina (proteína solúvel no plasma sanguíneo), que é convertida em trombina por ação catalítica da tromboplastina (OLCZYK *et al.*, 2014). Então, em sua forma ativa, a trombina catalisa a reação em que o fibrinogênio sérico (proteína solúvel no plasma sanguíneo) é clivado, formando monômeros de fibrina, processo tal, conhecido como fibrinogênese. Os monômeros de fibrina se polimerizam pela ação do fator XIII¹, para que, junto com plaquetas, forme um tampão hemostático, impedindo a perda de sangue (OLCZYK *et al.*, 2014; KOCH & ZERNECKE, 2014; ISAAC *et al.*, 2010). Enquanto o coágulo sanguíneo no interior

¹ Fator XIII: enzima transglutaminidase que liga, de forma cruzada, a fibrina à fibronectina e esta ao colágeno (KOCH & ZERNECKE, 2014).

do lúmen do vaso mantém-se em equilíbrio hemostático, o coágulo de sangue formado no local da ferida exerce importante papel (LOPES, 1999) na formação de uma matriz extracelular provisória rica em fibrina, que serve como “leito” para migração das células do infiltrado inflamatório que irão liberar os primeiros fatores de crescimento para dar início à reposta inflamatória. Essa matriz temporária servirá, também, como suporte para as demais etapas do processo de cicatrização (OLCZYK *et al.*, 2014; LIECHTY, 2013; ISAAC *et al.*, 2010). As plaquetas, além de essenciais à formação desse tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores químicos, incluindo fatores de crescimento que atuam na ativação e regulação de cascatas de sinalização do processo de reparo (ISAAC *et al.*, 2010). Pela indução da trombina, as plaquetas sofrem desgranulação e liberam fatores de crescimento tais como: TGF- β ² e VEGF³ (COUTO *et al.*, 2015).

2.2 - Inflamação

Um dos eventos essenciais para o reparo do tecido injuriado é chamado de inflamação (FOLKMAN & SHING, 2015). Os primeiros registros sobre a inflamação foram feitos (em papel) por Cornelius Celcius no período de 30 anos a.C., descrevendo-a como uma doença caracterizada por quatro sinais cardinais: “rubor, tumor, calor e dor”. Posteriormente, atribuiu-se, por um escritor e médico grego, o acréscimo de um quinto sinal cardinal: a perda da função da área inflamada (CONSOLARO, 2009) (Figura 2).



Figura 2. Esquema representativo dos sinais cardinais característicos da inflamação. Fonte: <http://consultadeenfermagem.com/revisoes-academicas/outras-disciplinas/caracteristicas-gerais-da-inflamacao/>

² TGF- β : fator de crescimento transformante- β , principal citocina profibrogênica e anti-inflamatória. (KUMAR *et al.*, 2013)

³ VEGF: fator de crescimento endotelial vascular, ativador da angiogênese. (ISAAC *et al.*, 2010; KOH *et al.*, 2013)

A inflamação foi conceituada como doença até 1774, quando um cirurgião escocês (Jonh Hunter) desmitificou tal afirmação (CONSOLARO, 2009). Passando, portanto, a ser compreendida nos tempos atuais como uma resposta natural elaborada pelo organismo após sofrer um dano causado por microrganismos agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas (AHMED, 2011; LIMA *et al.*, 2007). Essa resposta de defesa é geralmente benéfica ao organismo, agindo em proteção do corpo contra quaisquer agentes nocivos que possam interromper as atividades normais do tecido (AHMED, 2011), além de promover a sobrevivência tecidual, reparo e conservação da energia do corpo (LIMA *et al.*, 2007). Entretanto, Lima, *et al.*, (2007) afirmam que uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada pode ser altamente prejudicial ao organismo.

A resposta inflamatória é composta por eventos vasculares, celulares e eventos que envolvem componentes da matriz extracelular (CONSOLARO, 2009). As reações vasculares e celulares típicas da inflamação são desencadeadas por substâncias químicas produzidas por vários tipos celulares ou derivadas de proteínas plasmáticas, sendo geradas ou ativadas em resposta ao estímulo inflamatório (AMORIM, 2014). Alterações nesses componentes da inflamação são responsáveis pela geração dos sinais cardinais. Segundo Crunivel *et al.* (2010), vários tipos celulares e moleculares participam ativamente e fundamentalmente nesse processo: leucócitos e proteínas plasmáticas, células endoteliais, células e componentes da matriz extracelular (MEC). A figura 3 mostra os principais componentes que participam da inflamação.

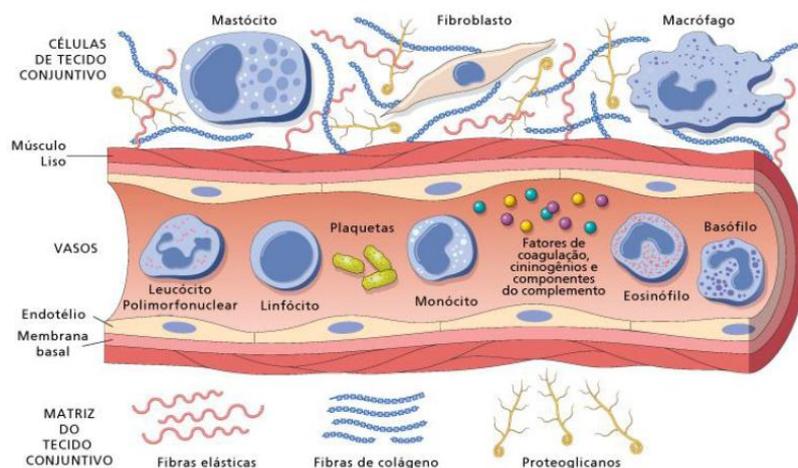


Figura 3: Componentes da resposta inflamatória e suas principais funções. Extraído de: Amorim, 2014, p.47.

2.2.1 - Resposta vascular do processo inflamatório

Em condições normais do organismo, moléculas e células de defesa circulam livremente pela corrente sanguínea (CRUVINEL *et al.*, 2010). Quando o organismo é surpreendido por uma lesão, imediatamente esses agentes de defesa são acionados e direcionados para o exato local do tecido lesionado ou infeccionado, dando início ao processo inflamatório (DE MENDONÇA *et al.*, 2009).

A primeira alteração vascular do processo inflamatório consiste no aumento do calibre do vaso sanguíneo, ou seja, uma vasodilatação que gera um aumento do fluxo sanguíneo e liberação do líquido plasmático ultrafiltrado contendo pouca proteína (transudato) (Figura 4). Como consequência dessa vasodilatação, há a sensação de calor e vermelhidão no local. Outra característica da inflamação é observada pelo aumento da permeabilidade desses vasos, possibilitando o extravasamento do plasma sanguíneo, rico em proteínas (albumina e fibrinogênio) e células, para fora dos vasos (exsudato) (OLCZYK *et al.*, 2014; CRUVINEL *et al.*, 2010) (Figura 5).

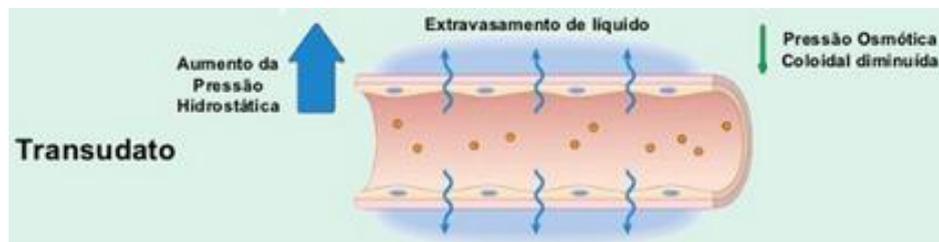


Figura 4: Principais manifestações vasculares no local da inflamação. Aumento do fluxo sanguíneo e saída do transudato. Extraído e adaptado de: Robbins & Cotran, (2007), p55.

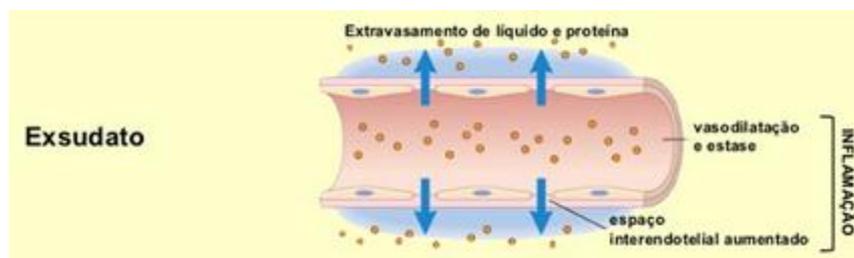


Figura 5: Principais manifestações vasculares e celulares no local da inflamação. Saída do exsudato. Extraído e adaptado de Robbins & Cotran, (2007), p55.

2.2.2 - Resposta celular do processo inflamatório

A resposta inflamatória inclui a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos e macrófagos que atuam como células fagocitárias removendo o tecido morto e mantendo a assepsia do local da ferida, além de liberarem citocinas e fatores de crescimento que desempenham importante papel na etapa seguinte do processo de cicatrização (OLCZYK *et al.*, 2014).

Devido ao extravasamento do exsudato (descrito anteriormente), a viscosidade dentro dos vasos e a concentração de hemácias são aumentadas, tornando seu fluxo lento. Com isso, é gerado um quadro de estase intravascular (ROBBINS, 2007), dando início às alterações nos componentes celulares da inflamação: os leucócitos se aproximam da parede endotelial (CRUVINEL *et al.*, 2010) e passam por um processo de rolamento sobre as células e ao longo dessa parede, o que faz com que diminua sua velocidade até parar por completo. Em seguida, estas células tornam-se ativas e aderem-se ao endotélio. Uma vez aderidos, os leucócitos sofrem diapedese e migram até o local danificado em resposta à quimiotaxia (ISAAC *et al.*, 2010; CRUVINEL *et al.*, 2010) (Figura 6). Além disso, com o evento da exsudação as pressões osmótica e hidrostática locais são alteradas, levando à formação do edema no local (CONSOLARO, 2009).

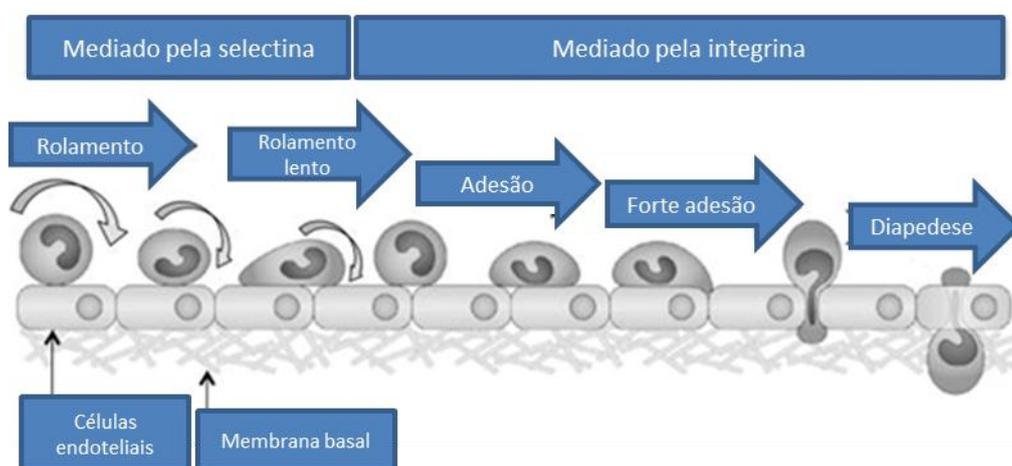


Figura 6: Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. Diapedese. Os macrófagos estimulados pelos indutores da resposta inflamatória produzem citocinas, como TNF- α que induzem as células endoteliais das vênulas a expressarem selectinas, ligantes para integrinas e quimiocinas. As selectinas medeiam a adesão fraca dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos leucócitos para o foco inflamatório. Extraído e adaptado de: Lowell *et al.*, (2012).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o tecido injuriado (LIBBY, 2007), atraídos pelo fator quimiotático CXCL1/KC que auxilia no recrutamento dos mesmos para o local da ferida (DE MENDONÇA *et al.*, 2009; LOPES, 2009).

Os neutrófilos têm por principal função, remover o agente agressor. Possuem receptores de membrana específicos que reconhecem microrganismos e células mortas, tornando-os alvo para fagocitose. A defesa contra bactérias realizada por esse tipo celular acontece por meio de potentes enzimas lisossômicas conhecidas como MPO (mieloperoxidase), destruidoras de microrganismos, e pela produção de radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Durante o processo, há a formação de superóxido (uma espécie reativa do oxigênio). O superóxido gera o peróxido de hidrogênio que é convertido em ácido hipocloroso (HClO) pela enzima mieloperoxidase. O HClO gerado é que apresenta propriedades capazes de destruir a bactéria fagocitada (ROMAN *et al.*, 2008). A completa degradação das partículas fagocitadas ocorre em vesículas resultantes da união do lisossomo com o fagócito, onde ocorre a digestão por ação de metaloproteinases, como elastases, colagenases e catepsina G. (OLCZYK *et al.*, 2014; ROBBINS, 2008).

A mieloperoxidase é encontrada predominantemente em neutrófilos, representando mais de 5% do conteúdo proteico total da célula. É uma proteína catiônica, com peso molecular de 144 kD que consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos (ROMAN *et al.*, 2008). A enzima MPO é o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberado após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo. Sua síntese ocorre durante a diferenciação mieloide na medula óssea e está completa dentro dos granulócitos, previamente à sua entrada na circulação (PULLI *et al.*, (2013); ROMAN *et al.*, (2008).

O processo inflamatório é intensificado pela liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) por estas células (OLCZYK *et al.*, 2014). Num intervalo entre 24-48h, os neutrófilos entram em apoptose e, na medida em que essas células morrem, os monócitos se infiltram no local do tecido injuriado em resposta a estímulos quimiotáticos gerados pela quimiocina CCL2/MCP1. E ainda, sob o estímulo de substâncias como o IFN- γ (interferon- γ), os monócitos se diferenciam em macrófagos, de modo a aumentar sua estrutura (seu tamanho celular, o aparelho de Golgi, o número

de lisossomos, microtúbulos e microfilamentos) e capacidade metabólica (síntese proteica). É dessa forma que os macrófagos realizem sua função fagocítica (OLCZYK *et al.*, 2014; LIMA, 2007). Sua principal função é remover os corpos apoptóticos e tecidos mortos do local injuriado. Além disso, os macrófagos são as principais células a liberarem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e citocinas que ativam vias como a angiogênese e vias de deposição de matriz (VEGF e TGF- β) (KOH *et al.*, 2013; ISAAC *et al.*, 2010).

Os macrófagos variam funcional e fenotipicamente ao longo do processo inflamatório desempenhando duplo papel no processo de cura: por um lado, eles assumem um papel pró-inflamatório, observado no início da resposta inflamatória, caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , remoção de detritos (matriz e corpos apoptóticos), por meio da secreção de metaloproteínases (por exemplo, colagenase e elastase), além de liberarem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que facilitam a imunidade inata na eliminação de microrganismos; por outro lado, no entanto, são a principal fonte de mediadores químicos anti-inflamatórios como o TGF- β e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e biossíntese de matriz (OLCZYK *et al.*, 2014, KOH *et al.*, 2013). Desta forma, macrófagos de caráter pró-inflamatório assumem o fenótipo de macrófagos M1. Já os macrófagos M2 são aqueles que exibem propriedades anti-inflamatórias participando da reparação do tecido (GENSEL, 2015; KOH *et al.*, 2013).

Assim como os neutrófilos, os macrófagos removem microrganismos patogênicos do leito da ferida. Além disso, estas células desempenham um papel crítico para o início da reparação tecidual: o debridamento do tecido por meio da fagocitose dos neutrófilos apoptóticos e tecido morto, limpando a área de tecido injuriado (LOPES, 1999). Já a ação antimicrobiana dos macrófagos difere da dos neutrófilos pela síntese aumentada de NO que, ao reagir com peróxidos, resulta em um alto potencial destrutivo (ISAAC *et al.*, 2010). O óxido nítrico (NO) é um radical pequeno, formado a partir do aminoácido L-arginina por três isoformas distintas de óxido nítrico. A isoforma indutível (NOSi/NO-sintase induzida) é sintetizada por células inflamatórias, especialmente macrófagos. No entanto, muitas células participam na síntese de NO durante a fase proliferativa, após a lesão. O NO liberado por intermédio do NOSi regula a formação de colágeno, proliferação celular e contração da ferida de maneiras distintas em modelos animais de cicatrização de feridas (WITTE & BARBUL, 2002). Vale ressaltar que, nessa fase do processo de cicatrização, o NO também age na

vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular, e é majoritariamente produzido por enzimas intracelulares, presentes em todos os tecidos (NOSi/NO-sintase induzida). A síntese dessas enzimas é estimulada, principalmente, por IL-1, TNF- α e IFN- γ , e inibida por TGF- β (ISAAC *et al.*, 2010). Os resultados da pesquisa realizada por Tomiosso *et al.*, (2008) também confirmaram que o NO tem relevante importância na modulação da cicatrização de uma lesão ocorrida no tendão; a redução na biossíntese deste composto leva ao retardamento e prejuízo na reestruturação da MEC.

Os mastócitos constituem outro tipo celular conhecido por estar envolvido numa variedade de processos de defesa do organismo, seja esse processo normal ou patogênico, incluindo a inflamação crônica (HART, 2015). São células residentes, amplamente distribuídos por todo tecidos conjuntivos. Estas células são particularmente numerosas abaixo da camada subcutânea ao lado de vasos sanguíneos e nervos. Eles têm o potencial de secretar um amplo espectro de mediadores biologicamente ativos, citocinas e quimiocinas que podem e exercer diversos efeitos sobre as células circundantes e tecidos (AGIER *et al.*, 2015). Embora o foco do papel dos mastócitos têm sido em reações agudas, é claro que essas células também desempenham papéis importantes em diversas condições crônicas (HART, 2015). Portanto, os mastócitos são importantes células na manutenção da homeostase através de seu envolvimento na angiogênese, remodelação/reparo tecidual e regulação da permeabilidade vascular, atuando na modulação da inflamação (pela ação de seus mediadores químicos) com efeitos pró e anti-inflamatórios (AGIER *et al.*, 2015).

No final da inflamação, os linfócitos também se infiltram no ambiente da ferida, influenciando a proliferação de fibroblastos e a biossíntese de colágeno (ISAAC *et al.*, 2010).

2.2.3 - Participação dos mediadores químicos

Os mediadores químicos são polipeptídeos secretados na região lesionada que interagem com a MEC. Tais moléculas não só controlam o processo inflamatório, mas também, participam do recrutamento e ativação neutrófilos, monócitos/macrófagos, células endoteliais e fibroblastos criando condições para iniciar as fases do processo de cura. (OLCZYK, 2014; LIECHTY, 2013; KOH *et al.*, 2013; ISAAC *et al.*, 2010).

De acordo com Wilgu (2012), uma variedade de mediadores está envolvida nas diferentes etapas do reparo (hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento) de um tecido injuriado, provocando efeitos diversos em várias células alvo (Tabela 1).

Tabela 1: Participação dos mediadores nas diferentes etapas do processo de Cicatrização

Mediador	Função	Referências
TGF-β	- Agente anti-inflamatório e fator pró-fibrogênico. - Controle do processo inflamatório - Recrutamento e ativação de fibroblastos	(KUMAR <i>et al.</i> , 2013)
VEGF	- Ativação de células endoteliais para o início do processo de angiogênese. - Controle do processo inflamatório - Recrutamento e ativação de fibroblastos	(KOH <i>et al.</i> , 2013; ISAAC <i>et al.</i> , 2010)
TNF-α	- Agente pró-inflamatório - Controle do processo inflamatório - Recrutamento e ativação de fibroblastos	(GUSMAN <i>et al.</i> , 2015; OLCZYK, 2014)
CxCL1/KC	- Recrutamento de neutrófilos	(DE MENDONÇA <i>et al.</i> , 2009)
CCL2/MCP1	- Recrutamento de monócitos/ macrófagos	(GUSMAN <i>et al.</i> , 2015; DE MENDONÇA <i>et al.</i> , 2009)

No contexto da inflamação e reparo, o TGF- β atua como um agente anti-inflamatório, além de ser um fator pró-fibrogênico potente que estimula a produção de componentes da MEC como fibronectina, colágeno proteoglicanos (WILGUS, 2012). O TGF- β , é secretado pelas plaquetas por degranulação, e, neste primeiro momento, tem como função atrair neutrófilos e monócitos e, assim, iniciar a resposta inflamatória.

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, secretada pelos macrófagos, que medeia a inflamação e desempenha importante papel em várias doenças inflamatórias crônicas incluindo psoríase, doença inflamatória do intestino e diabetes (GUSMAN *et al.*, 2015; KOH *et al.*, 2013).

O VEGF é uma citocina liberada por macrófagos que ativa e modula a angiogênese (OLCZYK *et al.*, 2014; KOH *et al.*, 2013).

A ativação da cascata de coagulação, juntamente com a liberação dos fatores de crescimento e ativação de células parenquimatosas pela lesão, produz numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos tais como CxCL1/KC e CCL2/MCP1 que auxiliam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, para o local da ferida (GUSMAN *et al.*, 2015; DE MENDONÇA *et al.*, 2009; LOPES, 2009).

Embora a inflamação seja uma etapa primordial para o reparo tecidual, os componentes da reação inflamatória que destroem e eliminam microrganismos e tecidos mortos também podem causar danos ao tecido normal quando essa inflamação é extensiva, prolongada ou não regulada (AHMED, 2011; LIMA, 2007), podendo contribuir para a patofisiologia de muitas doenças crônicas (LIBBY, 2007).

2.3 - Proliferação

A fase proliferativa envolve essencialmente a geração do material de reparo. Neste estágio é ressaltada a importância dos fibroblastos, por produzirem o colágeno que corresponde ao principal componente da matriz extracelular, responsável pela força e integridade do tecido, o qual sustenta uma recente e frágil rede de capilares que mantém a base da formação do tecido de granulação (rede de neovasos e colágeno recém-sintetizado), de aparência vermelha e heterogênea, havendo crescimento de capilares ao redor da lesão (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998).

2.3.1 – Angiogênese

A angiogênese é uma etapa do processo de reparo, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes (GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Consiste numa sequência de eventos de grande importância em processos fisiológicos e patológicos. O crescimento normal do tecido (como no desenvolvimento embrionário), cicatrização de feridas e ciclo menstrual, por exemplo, são caracterizados pela dependência da formação de novos vasos para fornecer o suprimento de oxigênio e nutrientes (GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Segundo os autores, existe uma correlação entre a angiogênese e doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares, inflamação crônica, diabetes, psoríases, endometriose, etc. A patologia, na maioria das vezes, associa-se com a formação exacerbada de novos vasos e, efeitos benéficos podem ser

conseguidos com terapêuticos de ação inibitória da angiogênese (GRIFFOEN & MOLENA, 2000). A importância da angiogênese se deve à sua participação na formação do tecido de granulação provisório e no suprimento de nutrientes e oxigênio para o tecido em crescimento (DE MENDONÇA *et al.*, 2009; GRIFFOEN & MOLENA, 2000; FOLKMAN & SHING, 1992). Além disso, sua importância se deve ao fato de células inflamatórias requererem a interação e transmigração (diapedese) por meio de vasos sanguíneos para entrarem no local da lesão (LI *et al.*, 2003).

De forma diferencial à angiogênese, têm-se, também, os eventos da vasculogênese e a arteriogênese. A vasculogênese refere-se à formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há vasos, através de estímulo de proliferação dos angioblastos (células precursoras do endotélio), originários do mesoderma esplâncnico (YOSHIDA, 2005). Nesse estágio inicial de desenvolvimento vascular, as células precursoras do endotélio vascular sofrem diferenciação, expansão e coalescência para formar a rede de túbulos primitivos do organismo (DE MENDONÇA *et al.*, 2009). Já a arteriogênese é um processo mais conhecido dos cirurgiões vasculares, que consiste em desenvolvimento de circulação colateral, tendo como precursoras as anastomoses vasculares pré-existentes, que se desenvolveriam mediante estímulos de força de cisalhamento, citocinas, moléculas de adesão, entre outras (YOSHIDA, 2005). Entretanto, o presente trabalho envolve o conceito da angiogênese no contexto inflamatório.

Nas duas últimas décadas, avanços na biologia celular e molecular têm reforçado a nossa compreensão sobre os processos biológicos envolvidos na angiogênese de reparação tecidual (LI *et al.*, 2003). Muitas doenças são acionadas por uma angiogênese persistente e não regulada, por exemplo: na inflamação crônica como a artrite reumatóide, onde novos vasos capilares invadem a cartilagem articular; na diabetes, cujos novos capilares na retina invadem o vítreo, causando hemorragia e cegueira; em tumor e metástases, a angiogênese é estimulada continuamente para o crescimento do próprio tumor (FOLKMAN & SHING, 1992).

A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais e é regulada por um equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos e ocorre tanto em processos fisiológicos como patológicos (JACKSON *et al.*, 1997). A indução da angiogênese foi, inicialmente, atribuída ao FGF ácido ou básico. Subsequentemente, muitas outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, incluindo o VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina

e angiopoetina-1. Baixa tensão de oxigênio e elevados níveis de ácido lático e aminas bioativas também podem estimular a angiogênese (DE MENDOÇA *et al.*, 2009). Para que ocorra a migração das células endoteliais e o desenvolvimento de novos capilares de estrutura tubular, há dependência não só das células e citocinas presentes, mas, também, de uma produção e organização dos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, vibronectina, tenascina e laminina, tanto no tecido de granulação quanto na membrana endotelial basal. A matriz extracelular é importante para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois, além de agir como "plataforma" que dá suporte à migração celular, age também, como reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento (DE MENDONÇA *et al.*, 2009).

Normalmente, no adulto, vasos sanguíneos quiescentes são continuamente encobertos na superfície basal constituída, principalmente, de lamininas, colágeno tipo IV, nidógenos e proteoglicanos (SENGER& DAVIS, 2014) (Figura 7).

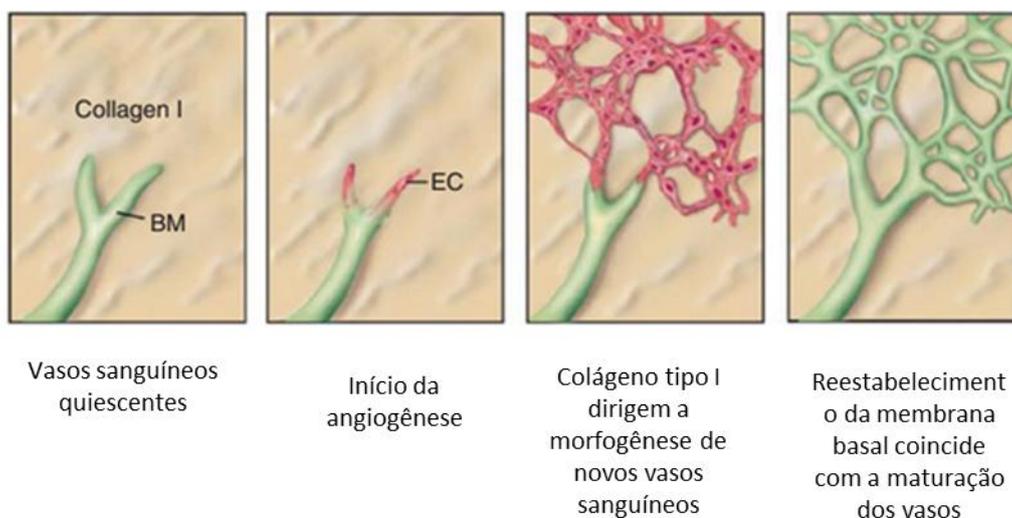


Figura 7: Esquema da formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Extraído e adaptado de: Senger & Davis, (2014).

A proliferação das células endoteliais adjacentes e dentro da ferida leva à deposição, de forma transitória, de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso. Assim, no processo de angiogênese, é necessário que as células endoteliais expressem receptores para fibronectina, organizando-as como um canal, de modo a permitir o movimento das células endoteliais. A expressão e atividade de proteases que degradam a membrana basal e a MEC também são necessárias à angiogênese,

principalmente na fase de remodelagem (DE MENDONÇA *et al.*, 2009). A liberação de metaloproteinases (MMPs) no local inflamado tem a finalidade de degradar a membrana basal que envolve os vasos. As MMPs são endopeptidases secretadas por diversos tipos celulares (células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos), em forma de zimogênio que se tornam ativas no compartimento da matriz extracelular, e subsequentemente degradam seletivamente componentes da MEC (MENDONÇA *et al.*, 2009; GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Este processo permite a migração das células endoteliais e a expansão do tubo em desenvolvimento (DENIPOTI *et al.*, 2006). A degradação da membrana basal pelas MMPs favorece o brotamento desses vasos quiescentes. A partir de então, tornam-se altissimamente permeáveis a proteínas do plasma sanguíneo. Esse aumento da permeabilidade promove o extravasamento de proteínas da matriz extracelular (fibrinogênio, vitronectina e fibronectina) provenientes do sangue. Por isso, acredita-se que as fases iniciais de germinação de novos vasos procedem em um ambiente rico em colágeno preexistente em combinação com fibrina, vitronectina e fibronectina provenientes do plasma sanguíneo. O fibrinogênio é subsequentemente convertido em fibrina (por meio da ação da enzima trombina), e juntamente com a vitronectina e a fibronectina, formam uma matriz provisória, essencial para a formação dos novos vasos. Logo as células endoteliais quiescentes migram para o estroma perivascular, ocorre a ativação e iniciam o brotamento e a proliferação das células endoteliais dentro da MEC provisória; o lúmen é formado dentro dos brotos, criando assim tubos vasculares. Em seguida, os tubos vasculares neoformados são novamente envoltos em membrana basal vascular com pericitos associados e, assim, alcançam a estabilidade (SENGER E DAVIS, 2014; DA SILVA *et al.*, 2007; GRANT E KLEINMAN, 1997) (Figura 8).

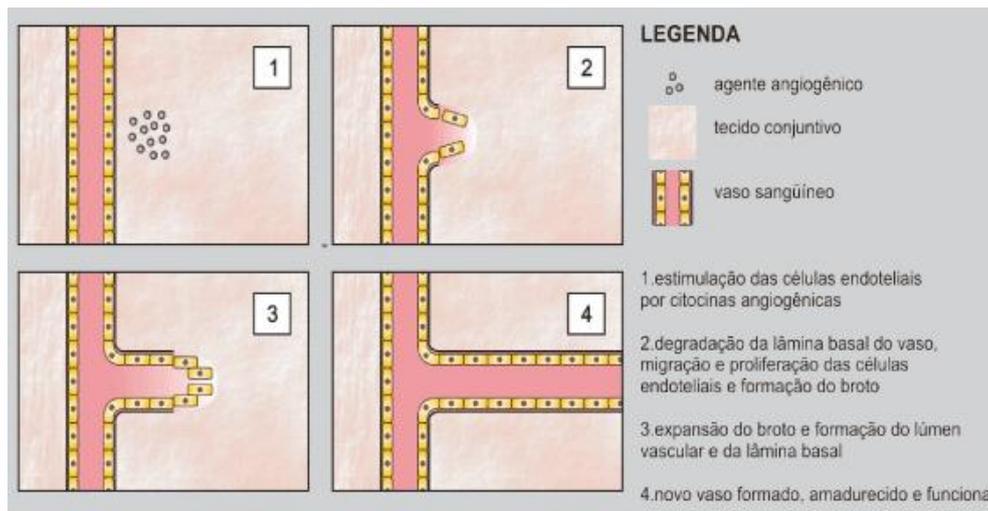


Figura 8: Representação esquemática da angiogênese. Extraído de: DA SILVA *et al.*, (2007).

A interação que ocorre entre células endoteliais e MEC é fundamental para a angiogênese. Essas células precisam se proliferar e sobreviver. Sendo assim, a adesão das células endoteliais à MEC, por intermédio das integrinas, se faz necessária para a ativação das vias de sinalização (Erk1/Erk2) que promoverão a proliferação e sobrevivência de CE e angiogênese. Sem a adesão, ocorre a indução de apoptose dessas células e, portanto, a angiogênese não acontece (SENGER & DAVIS, 2014).

A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais é essencial ao desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos e nos processos inflamatórios (DA SILVA *et al.*, 2007). Segundo JACKSON *et al.*, (1997), existe crescente evidência de que há uma codependência entre a angiogênese e a inflamação crônica. Para os autores, esta interligação relaciona-se com o aumento da migração e da proliferação de células inflamatórias, bem como com a ação regulatória de mediadores químicos. Contudo, os aludidos autores afirmam que tal interação pode ser extremamente prejudicial ao tecido sadio, uma vez que novos vasos sanguíneos podem fomentar a resposta inflamatória crônica, através do transporte de células inflamatórias para o local, fornecendo nutrientes e oxigênio para o tecido inflamado se proliferar. Por outro lado, o processo inflamatório pode promover a angiogênese por intermédio dos mediadores químicos liberados por células inflamatórias. Com o aumento da área de superfície endotelial, aumenta-se também as possibilidades de produção de mediadores químicos (em sua maioria, produzidos por monócitos/macrófagos provenientes da corrente sanguínea) que ativam a formação de novos vasos. Ainda mais, para os autores citados

anteriormente, o VEGF parece ser o principal fator de crescimento modulador da angiogênese, promovendo a proliferação de células endoteliais e migração.

No que se refere à ação anti-inflamatória sob o tecido, a mensuração do volume vascular está relacionada com a massa do tecido. Sendo assim, um efeito anti-inflamatório deve corresponder à diminuição do volume vascular e consequentemente à diminuição da massa tecidual (JACKSON *et al.*, 1997).

2.4 - Remodelamento

A fase de remodelação é caracterizada pela remodelagem do colágeno depositado pelos fibroblastos na fase de proliferação para formar o tecido cicatricial (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998).

3 - Inflamação crônica

O processo inflamatório é subdividido em fase aguda e fase crônica da inflamação. Na maioria dos casos, as fases agudas e crônicas das inflamações seguem uma sequência cronológica, sendo sempre caracterizadas pela saída de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos. A inflamação aguda é uma resposta rápida do hospedeiro com o objetivo de liberar para a área de infecção ou de lesão tecidual os leucócitos e as proteínas plasmáticas que atuarão no processo de defesa. Seu início é rápido (poucos minutos) e sua duração é curta (algumas horas a poucos dias). As principais características da fase aguda da inflamação são: vasodilatação e edema acentuados, associados a emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Como se sabe, inúmeras variáveis podem modificar os eventos básicos que acontecem na inflamação, incluindo a natureza e a intensidade da agressão, o local afetado e a responsividade do hospedeiro. Contudo, todas as reações inflamatórias agudas seguirão um dos três seguintes caminhos (AMORIM, 2014; CONSOLARO, 2009), representados pela figura 9:

- Regeneração, quando o tecido antes inflamado sofre regeneração completa. Esse tipo de evolução ocorre quando a destruição tecidual é relativamente pequena e quando as células parenquimatosas podem proliferar.

- Cicatrização, em que há formação de tecido conjuntivo fibroso no local da área lesada. A cicatrização ocorre após destruição de grande quantidade de tecido ou quando a agressão envolve tecidos incapazes de regenerar.

- Progressão para inflamação crônica, o que ocorre quando a resposta inflamatória aguda não é suficiente para eliminar o agente agressor, seja pela persistência da agressão ou pelo alto grau de patogenicidade (AMORIM, 2014).

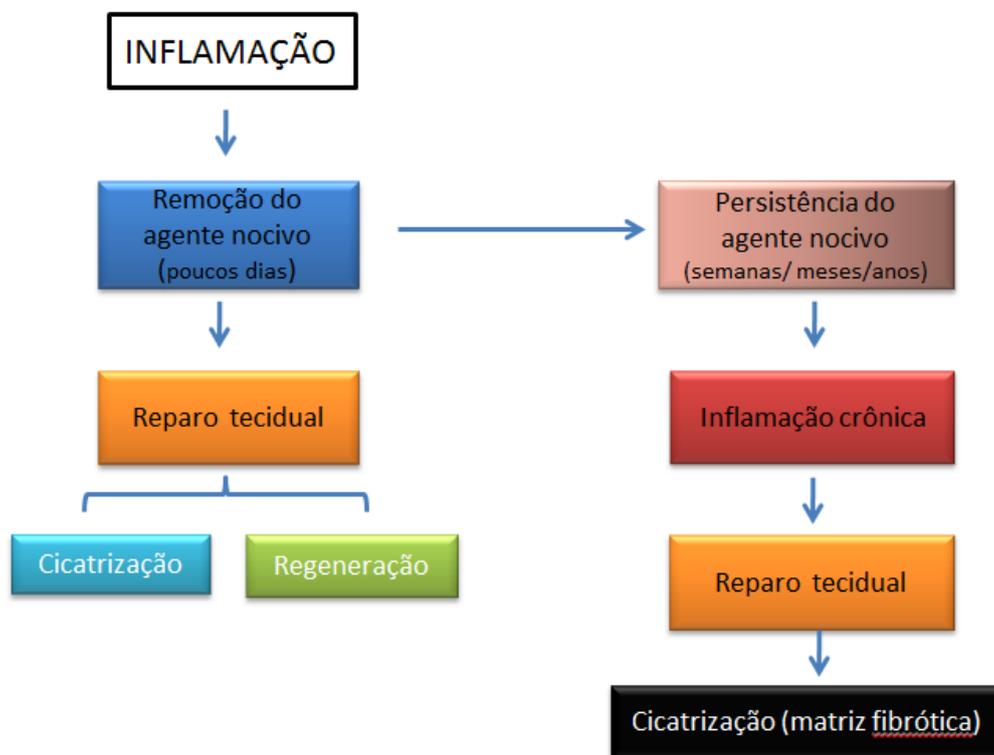


Figura 9: Resultado da inflamação: cura por cicatrização ou cicatrização com formação de matriz fibrótica.

A inflamação crônica é o padrão de reação inflamatória que apresenta duração prolongada (semanas ou mais), no qual a inflamação, a lesão tecidual e as tentativas de reparo coexistem (AMORIM, 2014). Diferente da inflamação aguda (caracterizada por alterações vasculares, predominância de neutrófilos no infiltrado), a inflamação crônica apresenta infiltrado celular predominado por macrófagos que chegam mais tardiamente para limpar a área preparando-a para a reparação ou para contrapor-se ao agente agressor persistente. Junto com os macrófagos, os linfócitos e plasmócitos geralmente

fazem parte do típico infiltrado da inflamação crônica que, de forma generalizada é referido como infiltrado mononuclear (CRUVINEL *et al.*, 2010; CONSOLARO, 2009).

A inflamação crônica pode seguir a reação aguda, ou pode começar discretamente, como uma resposta de baixo grau de intensidade. Esse último tipo de inflamação crônica é responsável pela lesão tecidual encontrada em muitas doenças tais como artrite reumatóide, aterosclerose e tuberculose. Na maioria dos casos na fase aguda, com a eliminação do agente agressor, promove-se a cura do processo com o reparo do tecido injuriado, ou seja, o organismo é capaz de remover e substituir as células lesadas resultando na normalidade histológica e funcional do tecido (CONSOLARO, 2009). No entanto, se a resolução da inflamação falhar, ou seja, se o agente nocivo não for removido e a normalidade do tecido não for alcançada, a inflamação aguda é, então, sucedida pela inflamação crônica (HART, 2015; AHMED, 2011). A resistência e a persistência do agente agressor induzem modificações de intensidade e características da inflamação estabelecendo-se a cronificação do processo. Diversos estímulos persistentes podem induzir a cronificação do processo inflamatório, tais como micobactérias, alguns vírus, fungos e parasitas; doenças inflamatórias imunomediadas, tais como doenças auto-imunes e alérgicas; exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, como partículas de sílica que levam à silicose ou componentes lipídicos endógenos tóxicos responsáveis pela aterosclerose (AMORIM, 2014; CRUVINEL *et al.*, 2010).

Algumas distinções da inflamação aguda e crônica podem ser visualizadas na tabela2.

Tabela 1: Características da inflamação aguda e crônica. Extraído e adaptado de Cruvinel *et al.* (2010).

	Inflamação aguda	Inflamação crônica
Agente causal	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos, trauma mecânico	Persistência do estímulo inflamatório inicial, autoimunidade
Células envolvidas	Neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos	Macrófagos, linfócitos, fibroblastos

Mediadores primários	Aminas vasoativas, eicosanóides, quimiocina, espécies reativas de oxigênio	IFNY, citocinas, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas
Início	Imediato	Tardio
Duração	Poucos dias	Meses ou anos
Evolução	Cicatrização com restituição <i>ad integrum</i>	Destruição tecidual e fibrose

Inflamações crônicas têm sido assunto para extensos estudos ao longo de décadas, não só pelo crescimento das condições patológicas associadas a uma sociedade moderna (conquista de muitas doenças transmissíveis e mudança de estilos de vida), mas, também, pelos mecanismos subjacentes, que permanecem, em grande parte, não resolvidos. Muitas vezes o estudo da inflamação crônica é superestimado pelo seu envolvimento com várias doenças (aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2, asma, doenças inflamatórias intestinais, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide e câncer) (AHMED, 2011). No entanto, ressalta-se que a inflamação crônica não é apenas um causador sintomático inicial dessas doenças, como, também, o grande impulsionador da patogênese (AHMED, 2011; O'BYRNE & DALGLEISH, 2001). Em condições inflamatórias crônicas, os principais danos causados ao organismo são mediados pela própria resposta inflamatória, e não por agentes nocivos, como os patogênicos (AHMED, 2011). Sendo assim, tem se tornado de grande relevância linhas de pesquisa que envolvem o estudo de substâncias que podem agir nos componentes da resposta inflamatória, na tentativa de modular a inflamação crônica. Dentre essas substâncias tem-se o extrato de *Casearia sylvestris*.

4 - *Casearia sylvestris*

Nos dias atuais, a Fitoterapia, que se encontra muito presente na medicina popular, busca impetuosamente por novas substâncias com propriedades terapêuticas, e constitui-se como a base dos estudos da Etnofarmacologia, uma ciência voltada para sistemas tradicionais de tratamento. Tais tratamentos surgem das relações entre povos e

plantas e fundamentam a procura por princípios ativos empregados em vários estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos, embora, muitas vezes, esses princípios de senso comum sejam usados pelo homem sem embasamento científico (ARAÚJO *et al.*, 2015).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, somada a uma rica diversidade étnica e cultural, detendo valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006; MARQUES *et al.*, 2013). E essa realidade tem fomentado, progressivamente, a busca pelo conhecimento de fitoterápicos, encarados pela medicina como uma forma adicional para tratar e prevenir doenças, especialmente as crônicas, tais como disfunções cardiovasculares e neurodegenerativas (MARQUES *et al.*, 2013), infecciosas, metabólicas, imunossupressão e câncer (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada, direta ou indiretamente, de vegetais, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (FELIPE, 2014), comumente representados em forma de chás, pós, extratos, infusões e outros tipos de formulações (MARQUES *et al.*, 2013).

De acordo com Marques *et al.*, (2013), a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), divulgada em 2009 pelo Ministério da Saúde, apresentou 71 plantas que podem subsidiar a elaboração de fitoterápicos para uso da população na assistência farmacêutica do SUS. Dentre essas espécies com potencial terapêutico, encontra-se a *Casearia sylvestris*, cujo valor medicinal dos seus extratos e compostos isolados é ressaltado pelo seu potencial farmacológico popularmente conhecido (FERREIRA *et al.*, 2011), fato que instiga o estudo de suas propriedades biológicas como forma de assegurar suas aplicações terapêuticas (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Casearia sylvestris é uma planta arbórea pertencente à família Salicaceae. Possui altura de 4-6 metros e tronco de 20-30cm de diâmetro (Figura 10). Suas folhas apresentam pontos translúcidos correspondentes às glândulas que contêm o óleo essencial e seus frutos possuem sementes envolvidas por uma cápsula vermelha (ARAÚJO *et al.*, 2015; TININIS, 2006) (Figura 11).

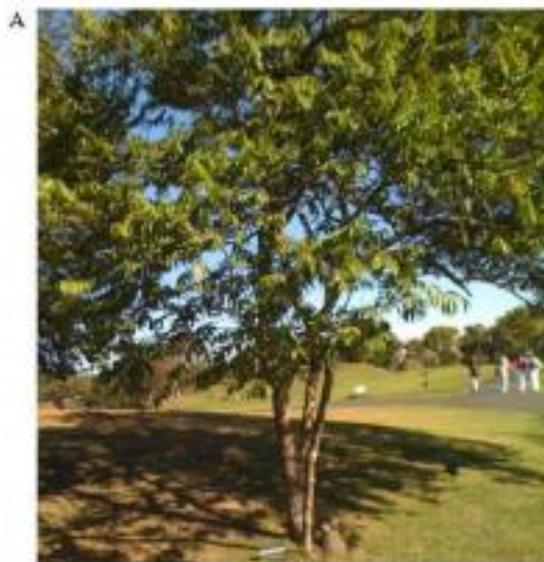


Figura 10: Árvore de *Casearia sylvestris* Swart. Extraído de: Felipe, (2014).



Figura 11: *Casearia sylvestris*. Inflorescência, fruto e folha respectivamente. Extraído e adaptado de: Kulchetscki, (s/d).

É também conhecida, na cultura brasileira, como “guaçatonga”, palavra de origem “Tupi-Guarani”, sendo utilizada por várias comunidades indígenas no tratamento de diversas doenças (ARAÚJO *et al.*, 2015; BOU *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2011). A tribo indígena Karajá, por exemplo, faz uma maceração da casca para tratar a diarreia; outras tribos brasileiras esmagam as suas raízes para cuidar de feridas, hanseníase e tratamento antiofídico. Os nativos da tribo Shipibo-Conibo (Peru) utilizam propriedades da casca para tratamento contra gripe e resfriados (DE CAMPOS *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2011). Outros nomes também são popularmente reconhecidos na identificação da *Casearia sylvestris*, tais como “erva-de-lagarto”, “língua-de-tiú”, “cafezinho-do-mato”, “corta-língua” e “café selvagem (DE CAMPOS *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2011; CARVALHO, 2009). Ela é encontrada em pelo menos 22 estados brasileiros (desde o Amazonas ao Rio Grande do Sul) e em alguns países como México, Argentina, Uruguai, Cuba, Porto Rico, Bolívia e Peru (ARAÚJO *et al.*, 2015; FELIPE, 2014; FERREIRA *et al.*, 2011). A *Casearia sylvestris* é capaz de florescer e

frutificar no segundo ano de vida, quando atinge cerca de 1 metro de estatura. Em certas regiões, estas espécies florescem mesmo em época de seca, entre agosto e dezembro. Com uma taxa de crescimento moderado, a planta vive, pelo menos, 20 anos. Sua propagação natural e artificial geralmente ocorre através de sementes e sua madeira é utilizada como combustível, além de ser adequada para construir cercas, postes, estacas, carpintaria rústica e manusear instrumentos (DE CAMPOS *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2011).

Na medicina popular, a decocção da folha da *Casearia sylvestris* é preparada tanto para uso oral, quanto para aplicação tópica (SASSIOTO *et al.*, 2004) no tratamento de aftas, herpes simples, úlceras gástricas, feridas, picadas de insetos, tratamento tópico de feridas, queimaduras, erupções cutâneas, eczema e vitiligo. São também utilizadas como cicatrizantes, antisséptica, antimicrobiana, hemostática, depurativa do sangue e anti-inflamatória (DE CAMPOS *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2013; LIPINSKI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2011; CAPOBIANGO *et al.*, 2009; DA SILVA, 2004).

O gênero *Casearia* caracteriza-se pela presença de várias substâncias de interesse (cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos) distribuídas em vários órgãos da planta (MARQUES *et al.*, 2013; TININIS, 2006). Entretanto, a maioria dos estudos fitoquímicos tem se concentrado nas folhas da *Casearia sylvestris* (CARVALHO *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013). Segundo Ferreira *et al.*, (2011), são as substâncias extraídas da folha da “guacatonga” que têm seu potencial anti-inflamatório enfatizado por pesquisadores.

Ao avaliar a composição do extrato obtido das folhas da *Casearia sylvestris*, detectaram que este é representado por 24 compostos. Dentre eles, o componente majoritário é um sesquiterpeno, chamado de α -zingibereno (FELIPE, 2014; BOU, *et al.*, 2013; TININIS, 2006), que corresponde a uma porcentagem de 48,31% do total de compostos em 2,9g deste óleo. Estes compostos correspondem a uma classe química característica que exibem ação antitumoral, antifúngica, antibiótica e anti-inflamatória (FELIPE, 2014; BOU, *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2011).

De acordo com Araújo e colaboradores, (2015), até o presente momento as pesquisas são insuficientes para garantir a segurança de preparações populares à base de *Casearia sylvestris* e não há nenhum medicamento fitoterápico com registro vigente na ANVISA obtido a partir dessa planta, apesar das várias propriedades farmacológicas descritas na literatura.

Apesar de a literatura disponibilizar vários trabalhos relacionados à *Casearia sylvestris* (MARQUES *et al.*, 2013) que relatam a atuação de vários sesquiterpenos na inibição da inflamação (BOU *et al.*, 2014), poucos são os trabalhos que estudaram esses efeitos *in vivo* (MARQUES *et al.*, 2013). Além disso, não há relato na literatura sobre os efeitos desses compostos sobre o componente inflamatório, angiogênico e fibrótico, quando estes ocorrem de maneira concomitante durante processos inflamatórios crônicos.

Considerando-se, portanto, o potencial terapêutico dos componentes do extrato de *Casearia sylvestris*, torna-se importante o estudo dos efeitos desses compostos sobre o processo inflamatório, angiogênico e fibrótico, essenciais no desenvolvimento e progressão da inflamação crônica, através de ensaios pré-clínicos os quais poderão contribuir com a descoberta de novas terapias.

5 - Matriz sintética e o estudo sobre o componente fibrovascular.

A implantação de matrizes sintéticas tem sido usada como uma estrutura para induzir o crescimento do tecido fibrovascular. O princípio comum desta técnica é a simulação das fases do reparo por meio da injúria causada pela introdução da matriz sintética no organismo do animal. Este modelo fornece, na maioria das vezes, um meio ambiente cronicamente inflamado, onde é possível caracterizar os componentes do tecido fibrovascular (CAMPOS *et al.*, 2006).

As técnicas que envolvem esponjas para avaliação do processo inflamatório foram utilizadas, pela primeira vez, por Grindlay & Waugh em 1951. Andrade e colaboradores, em 1987, modificaram essas técnicas para avaliar o crescimento de tecido conjuntivo vascularizado, bem como a atividade enzimática no tecido fibrovascular recém-formado. Atualmente, a técnica de implantação das esponjas representa um sistema conveniente que proporciona um acesso fácil a componentes da resposta inflamatória no compartimento esponjoso tais como células inflamatórias (emigração de neutrófilos e macrófagos), fluidos (conteúdo de hemoglobina, colágeno solúvel), citocinas (TNF- α , TGF- β , VEGF), quimiocinas (CxCL1/KC e CCL2/MCP1) e enzimas (MPO e NAG) de uma resposta inflamatória em curso (ARAÚJO, 2010; BAILEY, 1988). Dessa forma é possível determinar variáveis bioquímicas do tecido

fibrovascular e caracterizar mudanças histológicas do tecido e proliferação celular (CAMPOS *et al.*, 2006).

A esponja sintética pode ser facilmente removida do organismo animal, após o tempo desejado, para a avaliação dos componentes da inflamação (ARAÚJO, 2010) (Figura 12).



Figura 12: Matriz sintética de poliéster-poliuretano. Indutor da resposta inflamatória. Fonte: autoria própria.

6 - Objetivos

6.1 - Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do extrato bruto da *Casearia sylvestris*, em modelo pré-clínico de inflamação crônica induzida por implante sintético em camundongos.

6.2 - Objetivos específicos

- Estabelecer regimes de tratamentos que apresentem eficácia na modulação da resposta inflamatória induzida por matriz sintética;
- Analisar, por meio de parâmetros bioquímicos e histológicos, os efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o componente inflamatório (neutrófilos e macrófagos) através da atividade das enzimas MPO e NAG e dos mastócitos, pela coloração em lâminas com azul de toluidina;
- Analisar, por meio de parâmetros bioquímicos e histológicos, os efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o componente angiogênico através da dosagem do

conteúdo de hemoglobina pelo método do reagente de Drabkin, e da contagem de vasos sanguíneos pela coloração em lâminas com tricrômico de gomori;

- Analisar, por meio de parâmetros bioquímicos e histológicos, os efeitos do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a etapa de reparo tecidual através da dosagem de colágeno solúvel pelo método colorimétrico de picrossirius red, e dosagem do teor de colágeno em lâminas coradas com picrossirius red;
- Analisar a organização da matriz extracelular em todos os grupos experimentais.

7 - Justificativa

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas. As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também, como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais (25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Brasil conta com 22 a 24% de toda biodiversidade vegetal do mundo (GUSMAN *et al.*, 2015; MARQUES, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), o que faz da flora nativa nacional uma das mais ricas fontes de substâncias com potencial farmacológico (CALDERON *et al.*, 2010). No entanto, menos de 10% dessas “plantas-potenciais” foram avaliadas no que diz respeito às suas características biológicas, e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica, fato que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto conjunto de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Hoje em dia, o princípio curativo das plantas é mais disseminado em populações das zonas rurais e florestas distantes dos centros urbanos para o tratamento de problemas de saúde corriqueiros, tais como: cicatrização de feridas, processos inflamatórios, tratamento de lesões de pele e úlceras (FERREIRA *et al.*, 2011; CALDERON *et al.*, 2010). São áreas desprovidas de recursos econômicos, tecnologia, médicos e instalações clínicas, onde a

necessidade do uso de plantas terapêuticas mantém ainda viva essa tradição (FERREIRA *et al.*, 2011). Essas aplicações, em geral, indicam a presença de compostos biologicamente ativos, e seu conhecimento, transmitido por gerações, é chamado de medicina tradicional (CALDERON *et al.*, 2010).

Essa imensa biodiversidade atribuída ao Brasil, bem como sua rica cultura em conhecimentos sobre práticas de uso de plantas medicinais, dotam o país de imenso potencial para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (GUSMAN *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os fitoterápicos movimentam, anualmente, bilhões de dólares, sem incluir a economia informal da utilização popular de plantas medicinais nos países em desenvolvimento. O crescimento deste setor vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investirem nas pesquisas e patenteamento de novos produtos. O interesse internacional nas plantas medicinais nativas do Brasil é grande pela sua biodiversidade pouco conhecida, difundida e protegida (MARQUES *et al.*, 2013). Portanto, a combinação entre **megabiodiversidade** e a **rica medicina tradicional** coloca o Brasil em uma posição estratégica e privilegiada para o desenvolvimento de programas de descoberta de novos fármacos (CALDERON *et al.*, 2010).

O gênero *Casearia* tem sido categorizado como uma das plantas de alto potencial terapêutico, sendo alvo de estudos não só farmacológicos, como também da fitotecnia, química, toxicologia, biologia molecular/bioquímica, medicina complementar interativa, floresta e agricultura (MARQUES *et al.*, 2014). O conhecimento dos seus benefícios terapêuticos é amplamente difundido na medicina tradicional brasileira, bem como em vários países (MARQUES, 2013). Além de uma espécie tradicionalmente utilizada na sua medicina popular, é uma planta altamente reprodutível e adaptável a diferentes regiões e condições climáticas (FERREIRA *et al.*, 2011).

Utilizando a base de periódicos da *Web of Science* para geração dos dados quantitativos e identificação de indicadores científicos, Marques *et al.* (2013) identificaram 135 artigos sobre a espécie *Casearia sylvestris* desde 1962, sendo observado um crescimento no número de artigos publicados em vários países a partir do ano 2000 (Figura13). Segundo os pesquisadores, o Brasil foi o país que mais desenvolveu pesquisas sobre esta espécie (Figura14).

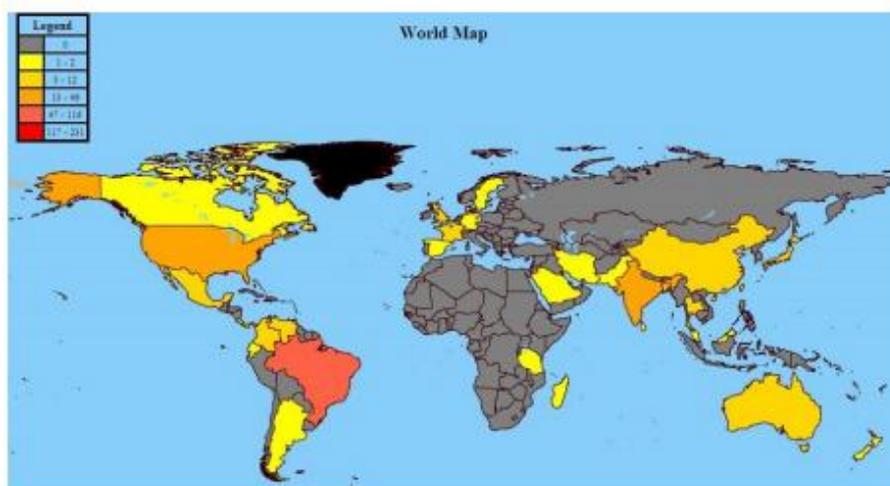


Figura 13: Participação mundial em artigos sobre o gênero *Casearia*, publicados na *Web of Science*. Extraído de: Marques *et al.*, (2013).

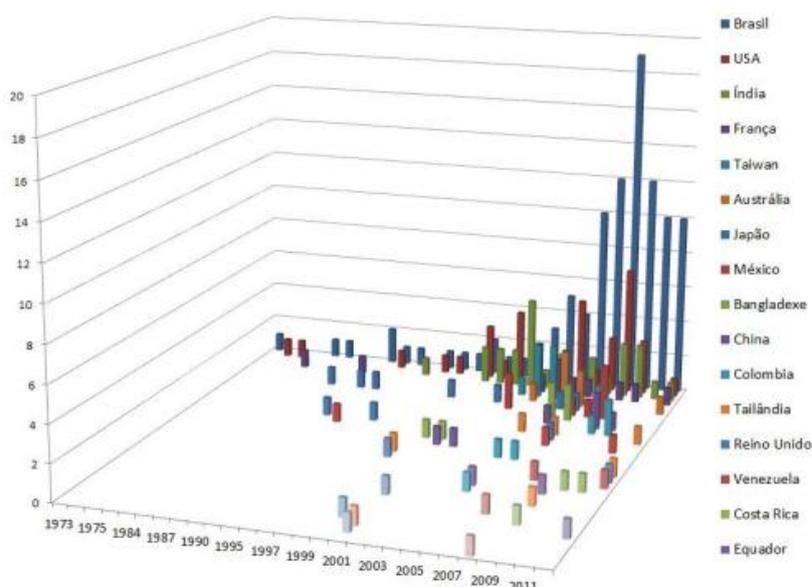


Figura 14: Número de publicações por país do gênero *Casearia* do período de 1973 a 2012 na base de dados da *Web of Science*. Extraído de: Marques *et al.*, (2013).

Como relatado na pesquisa de Marques *et al.* (2013), a literatura disponibiliza vários trabalhos relacionados à *Casearia sylvestris*. Entretanto, no que diz respeito à atuação da *Casearia sylvestris* nos processos inflamatórios, poucos trabalhos foram relatados, especialmente os que estudam esses efeitos *in vivo*. Para mais, não há relato, na literatura, em relação aos efeitos desses compostos sobre o componente inflamatório, angiogênico e fibrótico, quando esses ocorrem de maneira simultânea a processos inflamatórios crônicos. Além disso, de acordo com Araújo *et al.* (2015), até o presente

momento as pesquisas realizadas são insuficientes para garantir a segurança de preparações populares à base de *Casearia sylvestris* e não há nenhum medicamento fitoterápico com registro vigente na ANVISA obtido a partir dessa planta, apesar das várias propriedades farmacológicas descritas na literatura.

Nesse aspecto, torna-se relevante a análise do potencial terapêutico do extrato bruto de *Casearia sylvestris* no desenvolvimento e progressão da inflamação crônica. Estima-se que a avaliação do processo inflamatório, angiogênico e fibrótico em ensaios pré-clínicos, mediante a utilização deste fitoterápico, irá contribuir com os estudos e descoberta de novas terapias que tendem a otimizar os eventos (angiogênico e fibrótico) do processo inflamatório crônico, levando a uma diminuição do tempo de tratamento, eficiência dos processos envolvidos no reparo e conseqüentemente, à diminuição do sofrimento do paciente (MARQUES *et al.*, 2013).

Além disso, nota-se que o Brasil é munido de grande capacidade de inovação e geração de novas estratégias terapêuticas, com potencial para, na área de saúde, desenvolver modelos que primem pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade brasileira, podendo, assim, gerar riquezas para o país, alcance social e redução de custos dos tratamentos (MARQUES *et al.*, 2013).

8 - Materiais e métodos

8.1 - Modelo experimental

O modelo utilizado no presente trabalho envolve a implantação de matriz sintética de poliéster-poliuretano (esponja) na cavidade subcutânea da região interescapular dos camundongos. Esse tipo de modelo leva a uma resposta inflamatória do tipo crônica, uma vez que o corpo estranho (esponja) não é removido pelo organismo do animal. Por conseqüência, há a formação de uma “capa” fibrovascular ao redor dos discos de esponja, que fornecem o material necessário para as análises bioquímicas e histológicas. A utilização de implantes de esponja é bem caracterizada em modelos animais utilizando camundongos. Além disso, o modelo não apresenta alteração comportamental nesses animais, mostrando elevada tolerância aos procedimentos (ARAÚJO, *et al.*, 2010).

8.2 - Animais

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia/Minas Gerais. Protocolo: CEUA nº 156-13.

Foram utilizados para este estudo 60 camundongos C57/Bl/6, machos, com 8 semanas de vida e peso em torno de 30g (Figura15). A utilização dos camundongos dessa linhagem baseia-se no fato desses animais apresentarem pouca variação alélica (por serem isogênicos) gerando respostas mais homogêneas, diminuindo-se o número de animais a serem utilizados para a observação de determinadas variáveis analisadas no presente trabalho.

O cálculo do “n” experimental por grupo foi realizado com base nos valores médios e desvio padrão dos dados da variável mais instável a ser medida. Portanto, foram utilizados os dados da análise da atividade da enzima N-Acetil-β-D-Glicosaminidase (NAG) provenientes dos estudos prévios (ARAUJO, *et al.*, 2010).

Para as análises bioquímicas, 30 animais foram separados aleatoriamente e distribuídos em 5 grupos, estando 6 animais em cada: (1) controle salina, (2) controle DMSO1%, (3) tratado com doses de 10ng do extrato de *Casearia sylvestris*, (4) tratado com doses de 100ng deste extrato e (5) tratado com doses de 1000ng do mesmo extrato.



Figura 25: Grupo experimental “n” total igual a 60 animais.

Para as análises histológicas, 30 animais foram separados aleatoriamente e distribuídos em 5 grupos, estando 6 animais em cada: (1) controle salina, (2) controle DMSO1%, (3) tratado com doses de 10ng do extrato de *Casearia sylvestris*, (4) tratado com doses de 100ng deste extrato e (5) tratado com doses de 1000ng do mesmo extrato.

Os animais foram mantidos no depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas-UFU, em gabinetes com controle de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro de 12h. Tiveram livre acesso à ração comercial para animais de pequeno porte (Biobase®, Bio Tec) e água filtrada por filtro industrial, disponível até o dia do sacrifício.

8.3 - Preparo das dosagens do extrato bruto de *Casearia sylvestris*

O extrato bruto de *Casearia sylvestris* foi fornecido pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Diadema, sob forma de pó lipofilizado (49,2mg). No laboratório de Fisiologia do Instituto de ciências Biomédicas da UFU, 49,2mg desse pó foi dissolvido em 49,2mL de DMSO1%.

A solução mãe foi elaborada com 30 μL de *Casearia sylvestris* para 2970 μL de água destilada.

O preparo das doses de *Casearia sylvestris* foi feito com base na maior dose (1000ng) a partir da fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de animais por grupo} \times \text{dias de tratamento} \times 1000\text{ng}/10\mu\text{L}$$

Para o preparo das doses de 1000ng, utilizou-se 100 μL da solução mãe de *Casearia sylvestris*. E para as doses de 10ng e 100ng de *Casearia sylvestris* foi feita uma diluição seriada a partir da dose de 1000ng diluída em 900 μL de água destilada (Figura 16).

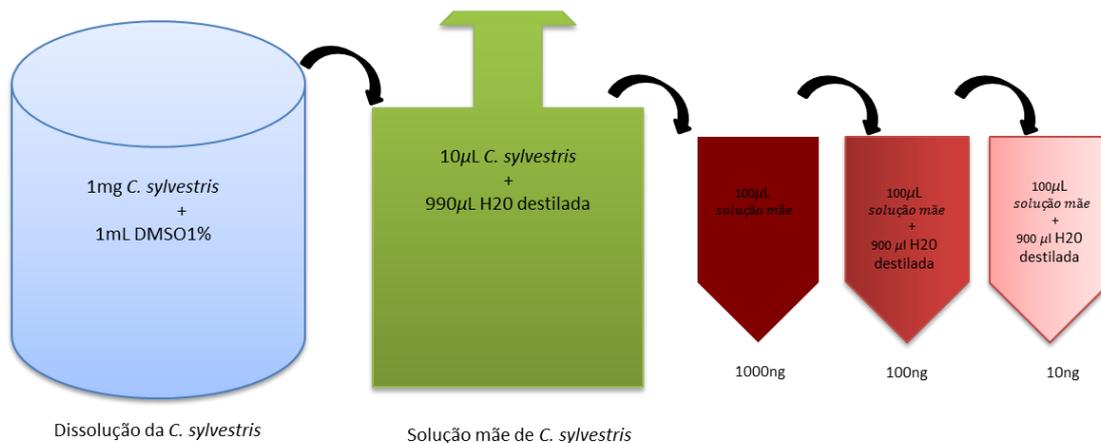


Figura 16: Preparo das doses a partir da solução mãe de *Casearia sylvestris*. Fonte: autoria própria.

8.4 - Técnica de implantação da esponja

Os implantes (discos obtidos a partir de uma folha de poliéster-poliuretano de 5mm de espessura, com o auxílio de um punch de 8mm de diâmetro) foram mantidas em álcool 70% v/v durante, pelo menos, 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidas em água destilada por 30 minutos (CASSINE-VIEIRA, 2014; ARAUJO, 2010; ANDRADE *et al.*, 1987).

O procedimento de implantação envolveu a aplicação prévia de anestesia (70µL) intraperitoneal nos animais com xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg). Em seguida foram submetidos à tricotomia dorsal com aparelho tricotomizador elétrico e assepsia da região dorsal com algodão e álcool 70% v/v. Os animais foram dispostos em mesa cirúrgica para a realização de uma incisão mediana dorsal de aproximadamente 1cm na pele, feita com um bisturi, em direção caudal. Posteriormente, foi realizada, a divulsão do tecido subcutâneo interescapular com auxílio de uma tesoura de divulsão. Em cada animal foi implantado 1 disco de esponja, posicionado, com o auxílio de uma pinça, aproximadamente 0,5cm da região interescapular. A sutura foi feita com fio de nylon 3,0 usando ponto Donati (ANDRADE *et al.*, 1987; CASSINE-VIEIRA, 2014; ARAUJO, 2010) (Figura 17).



Figura 17: Implante do disco de esponja. Diagrama de implante subcutâneo da esponja sintética. Implante do disco de esponja na cavidade subcutânea interescapular. Fonte: autoria própria.

Os animais foram mantidos em observação dentro de uma caixa, sob luz incandescente para mantê-los aquecidos até a recuperação do efeito da anestesia. Após recuperação os animais foram dispostos, separadamente, em caixas de polipropileno (30x19x12cm) devidamente etiquetadas com a identificação de cada grupo. Os animais foram transferidos para o depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas – UFU, acondicionados/condicionados em gabinetes apropriados com água e ração *ad libitum* (CASSINE-VIEIRA, 2014; ARAUJO, 2010).

8.5 - Tratamento

O tratamento intrainplante (10 μ L da dose) ocorreu diariamente, nos tempos 0 - 8 dias (Figura 18).

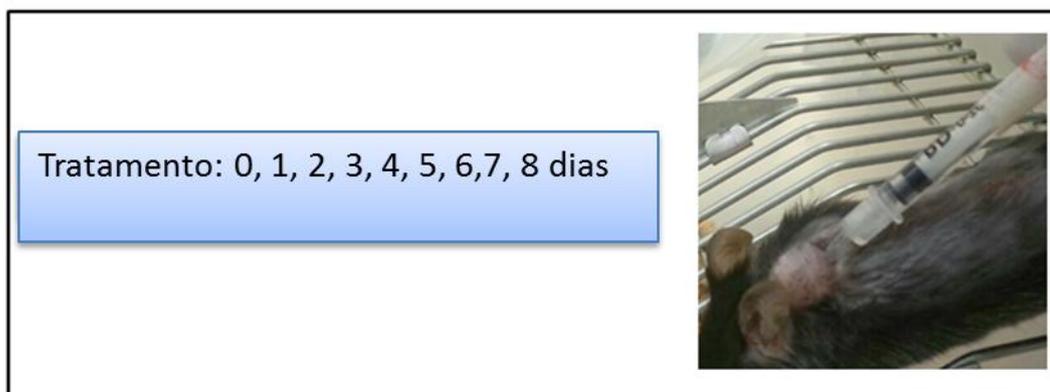


Figura 18: Tratamento: 10 μ L da dose, administrada intrainplante, nos tempos 0 - 8 dias.

8.6 - Remoção dos implantes

No 9º dia após a implantação, os animais foram eutanaziados por aprofundamento anestésico com 2mL de TIOPIENTAL (100mg/Kg) via intraperitoneal. O tiopental foi preparado 20 minutos antes do procedimento com adição de 30mL de solução salina diretamente no frasco.

Os discos de esponja foram removidos por meio de incisão mediana na região dorsal sentido apical, com o auxílio de uma tesoura. Ainda foi utilizada uma pinça para remoção de tecido muscular e adiposo que possivelmente estariam aderidos à esponja. As esponjas foram acondicionadas em eppendorfs, em seguida, pesadas e processadas para os ensaios bioquímicos e histológicos (Figura 19).



Figura 19: Remoção do implante dotado de material fibrovascular: (A) Remoção da esponja com o auxílio de uma pinça; (B) Implante removido; (C) Esponja acondicionada em eppendorf. Fonte: autoria própria

Após a remoção das esponjas os animais eutanasiados foram colocados em sacos brancos, congelados e descartados em local apropriado destinado ao lixo hospitalar, posteriormente coletado pelo serviço contratado especializado da UFU.

8.7 - Análises Bioquímicas

As esponjas removidas foram pesadas, seccionadas e acondicionadas em tubos eppendorf para realização dos ensaios bioquímicos e histológicos (Figura 20).

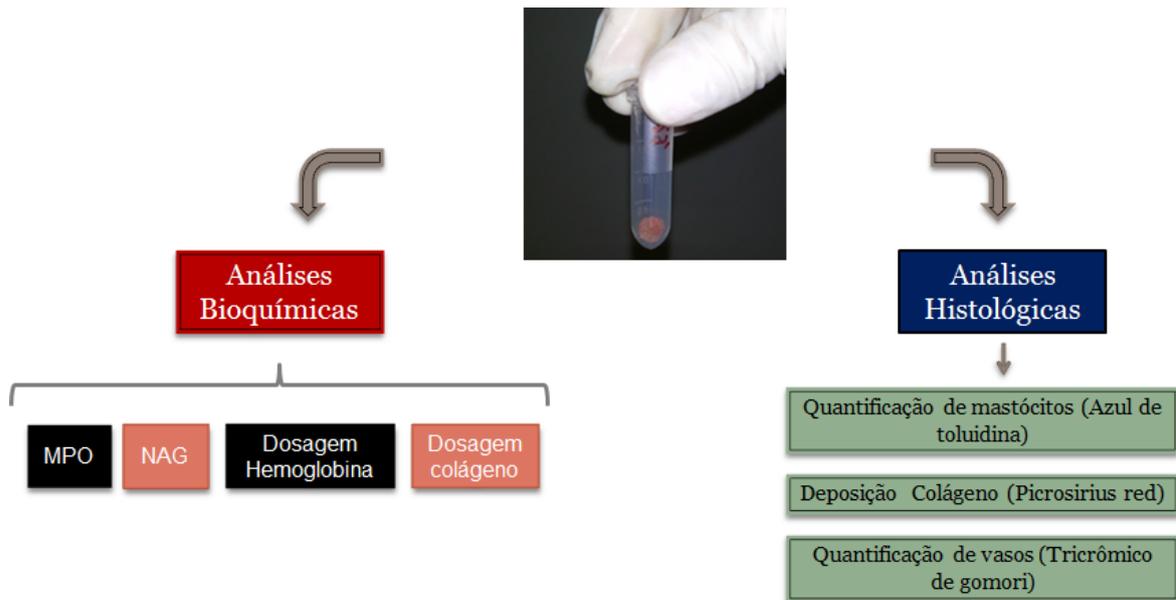


Figura 20: Ensaio bioquímico e histológico. Fonte: autoria própria.

A secção das esponjas ocorreu como observado na figura 21:

- ❖ ½ esponja para dosagem do colágeno solúvel;
- ❖ ½ da esponja para dosagem de Hemoglobina (esta porção de esponja foi novamente seccionada em duas partes: ¼ para dosagem de MPO e ¼ para dosagem de NAG).

O restante do material (filtrado, não filtrado e pallet), usado para dosar hemoglobina, foi armazenado, a -20°C .

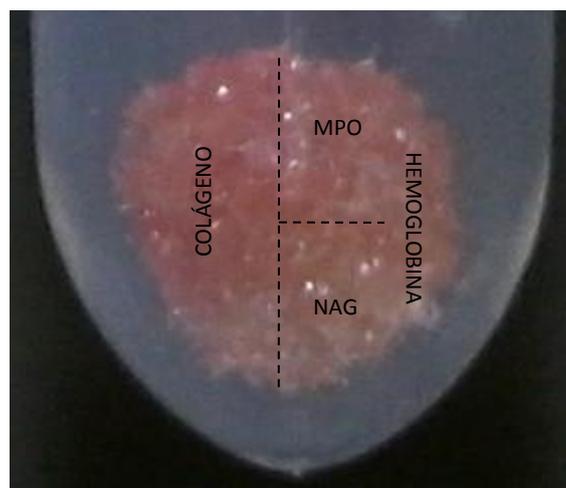


Figura 21: Representação ilustrativa das seções na esponja para testes bioquímicos. Fonte: autoria própria.

8.7.1 - Dosagem de Hemoglobina (Hb)

A dosagem do conteúdo de hemoglobina é uma forma de avaliação indireta da neovascularização. Foi realizada através do método do reagente de Drabkin, desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett (1990) e Hu (1995).

As esponjas foram translocadas dos eppendorfs para tubos de ensaio e homogeneizadas pelo Ultra Stirrer (80 ultra model – 8.000-30.000 rpm), em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina - LABTEST), por 10 segundos, e em seguida retornadas para os eppendorfs de 2,0mL. Aproximadamente 500µL das amostras foram centrifugadas por 40 minutos, a 10.000g a 4°C, e os homogenatos foram filtrados em filtros Millipore de 0,22µm (Membrana hidrofílica GV-DURAPORE, acoplada em suporte de filtro (SWUINNY) de aço inoxidável para a seringa). Uma alíquota de 200µL das amostras e padrões foi adicionada em placa de 96 poços, em duplicata, para leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm (Leitor de Elisa). A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C. A esponja (pallet) foi dividida e pesada para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).

8.7.2 - Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A análise da atividade da mieloperoxidase foi realizada através da técnica de Bradley (1982). Após a dosagem de hemoglobina, o precipitado (¼ esponja) foi ressuspenso em 2,0mL de tampão fosfato de sódio, 80 mM em pH=6. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Em seguida, foram transferidos 300µL dessa amostra para eppendorf de 1500µL e acrescentados 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,75% p/v diluído em tampão fosfato pH 6.

As amostras foram sonicadas por 10 segundos e, logo após, centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (200µL) foi utilizado no ensaio enzimático em eppendorf de 1500µL. A reação seguiu a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%; 100µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina – Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck) colocados ao mesmo tempo, por 1 minuto cronometrado. Para interromper a reação, adicionou-se 100µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) a 4M.

Em seguida, foram adicionados 200µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica feita em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido do implante).

8.7.3 - Avaliação da atividade N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Esta técnica baseia-se na hidrólise do p-nitrofenil-N- acetil-β-D-glicosamina (substrato) pelo N-acetil-β-D-glicosaminidase, liberando p-nitrofenol.

Essa enzima foi utilizada como um índice da atividade destas células no sítio inflamatório, pela técnica de Bailey, (1988).

Após a utilização da esponja para dosagem de hemoglobina, foi adicionada às amostras, 2,0mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). As amostras foram homogeneizadas, por, aproximadamente 40 segundos, usando o vortex, até obter uma suspensão homogênea. Posteriormente, foram centrifugadas em 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Então foram diluídas, em eppendorf de 1500 µL, uma amostra de 150 µL do sobrenadante em 150 µL de tampão citrato/fosfato.

Para o ensaio, foram adicionados 100µL/poço das amostras diluídas (em duplicata) à placa de ELISA de 96 poços. Nas amostras, foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase-Sigma), diluídos em tampão citrato/fosfato, pH 4,5. Em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos.

Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6 nas amostras e na curva. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm.

A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL⁻¹/mg de peso úmido do implante.

8.7.4 - Dosagem de colágeno (*Picrosirius Red*)

A deposição de colágeno foi avaliada pela sua dosagem solúvel presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total foi quantificada com base colorimétrica, pela reação do *Picrosirius Red*. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006).

As amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100) em vortex (30 segundos) e posteriormente centrifugadas a 6000g, por 10 minutos, a 4°C para remoção dos debris. Foram adicionados 50µL do sobrenadante para eppendorf de 1500 µL. Logo foram acrescentados 50µL do reagente *Picrosirius Red*. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente (25°C), por 25 minutos em capela de fluxo. O complexo colágeno-picrosirius red foi separado por centrifugação a 10,000g, durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, retirando o máximo de líquido possível, vertendo-se o tubo sobre papel absorvente. O sedimento foi lavado, delicadamente (para não remover o pellet) pelas paredes do tubo, com 500 µL de álcool puro (PA) e livre de metanol. Logo, todo etanol foi removido, vertendo-se com cuidado em papel absorvente. Foi adicionado ao sedimento, 1mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M).

A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (ELISA) onde foram transferidos 200µL das amostras, em duplicata.

A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de implante.

8.8 - Análises histológicas das matrizes sintéticas

As análises histológicas foram realizadas para avaliar o infiltrado fibrovascular nos implantes sintéticos, por meio da quantificação de mastócitos (azul de toluidina),

vasos sanguíneos (tricroômico de gômori) e colágeno (*Picrosirius Red* e polarização). Para tal, foi realizado um novo experimento, seguindo o mesmo protocolo de procedimentos e regime terapêutico para as análises bioquímicas.

Após a remoção dos implantes, os mesmos foram cuidadosamente fixados em solução de methacarn. Logo, foram submetidos às etapas de desidratação, diafinização, banho e inclusão em blocos de parafina. Os blocos contendo o material foram submetidos a cortes em micrótomo (secções de 5µm). Em seguida, os cortes foram devidamente posicionados em lâminas de vidro (previamente silanizadas com poli-lisina para melhor fixação dos cortes às lâminas). Logo, as lâminas foram condicionadas em estufa à 44°C, por 24 horas, e então, submetidas a procedimentos protocolados específicos para cada tipo de coloração anteriormente citada.

Toda a preparação do material histológico foi realizada no laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU.

As sessões coradas com *Picrosirius Red* foram examinadas no laboratório de cultura de células do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU, sob microscopia de polarização (NIKON ECLIPSE TI) em objetiva 20X, com uma câmera acoplada (LABOMED).

Para a captura e quantificação de mastócitos e vasos sanguíneos foi utilizado o microscópio do Instituto de Biologia (INBIO-UFU) com objetiva 40X.

Para todas as análises foram capturadas 10 áreas diferentes e a medição foi realizada com o programa de imagem J.

8.8.1 - Avaliação da deposição de colágeno

Após 24 horas na estufa, as lâminas foram coradas com picrosirius red. Esta técnica é simples, específica e sensível. Apresenta a vantagem de localizar e caracterizar, com precisão, os componentes de colágeno (MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Para análise e fotografias do colágeno, utilizou-se o microscópio de polarização do laboratório de cultura celular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU. Cada corte teve o registro fotográfico de pelo menos 10 campos.

8.8.2 - Quantificação de vasos sanguíneos

Após 24 horas na estufa, as lâminas foram coradas com Tricrômico de gômori para contagem de vasos sanguíneos no tecido. Os cortes histológicos foram analisados ao microscópio óptico do laboratório de histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU e registrados fotograficamente com objetiva de 40X, ocular de 10X. Cada corte teve o registro fotográfico de pelo menos 10 campos.

8.8.3 - Quantificação de mastócitos

Após 24 horas na estufa, as lâminas foram coradas com azul de toluidina para contagem de mastócitos no tecido. Os cortes histológicos foram analisados ao microscópio óptico do laboratório de histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU e registrados fotograficamente com objetiva de 40X, ocular de 10X. Cada corte teve o registro fotográfico de pelo menos 10 campos.

8.9 - Análises estatísticas

A análise e construção de gráficos foram realizados pelo programa estatístico GraphPad Prism 4.0. Foi utilizada a análise de variância one way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-keuls. Os resultados foram apresentados pelas médias \pm e.p.m. dos dados. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0.05$.

9 - Resultados

Os animais submetidos à implantação da esponja demonstraram boa tolerância ao material sob o padrão de comportamento normal, sem sinais visíveis de rejeição ao implante, infecção, toxicidade ou morte.

9.1 - Efeitos do tratamento no componente inflamatório

O componente inflamatório foi avaliado pela atividade enzimática de MPO, (enzima presente em neutrófilos) e NAG (enzima presente em macrófagos) - métodos indiretos para mensuração de neutrófilos e macrófagos no sítio inflamado. A inflamação foi avaliada também pelo infiltrado de mastócitos, um importante tipo celular que participa da reação inflamatória secretando para a matriz várias moléculas acumuladas no seu citoplasma, por exemplo, a histamina.

O tratamento com extrato bruto de *C. sylvestris* não mostrou alteração significativa em relação ao infiltrado de neutrófilos (MPO) nas três doses avaliadas, quando comparadas com o grupo salina (gráfico 1).

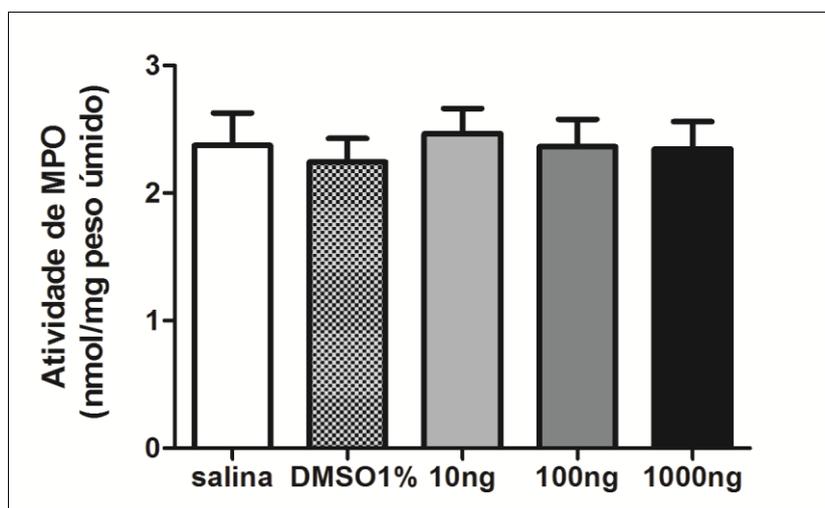


Gráfico 1: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sobre a atividade enzimática de MPO. O tratamento não mostrou alteração significativa em relação ao infiltrado de neutrófilos (MPO) nas três doses avaliadas.

O infiltrado de macrófagos expresso pela atividade da enzima NAG não demonstrou alteração significativa pelos tratamentos avaliados (gráfico 2).

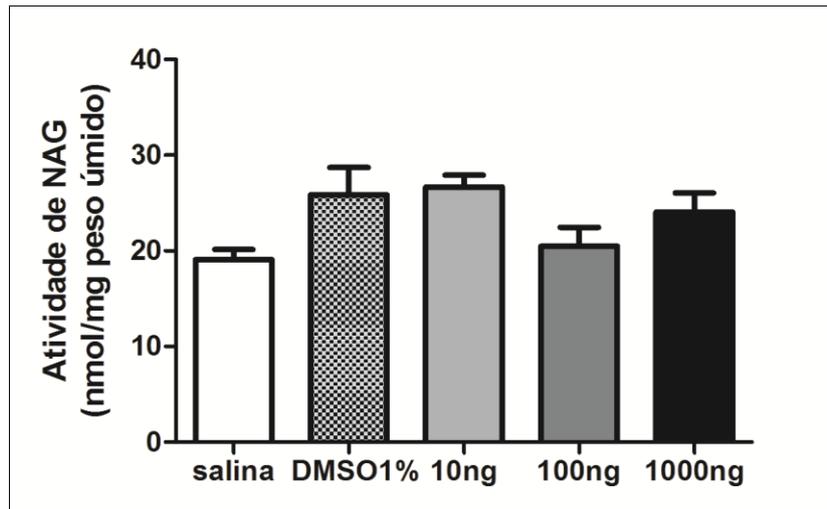


Gráfico 2: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sobre a atividade enzimática de NAG: método indireto para mensuração de macrófagos no sítio inflamado. O tratamento não mostrou alteração significativa sobre o infiltrado de macrófagos nas doses avaliadas.

Assim como para o infiltrado de neutrófilos e macrófagos no sítio inflamado, a quantificação de mastócitos nos cortes histológicos por AT (azul de toluidina) não apresentou diferença significativa para nenhuma das doses avaliadas em relação ao grupo salina (gráfico 3 e figura 22)

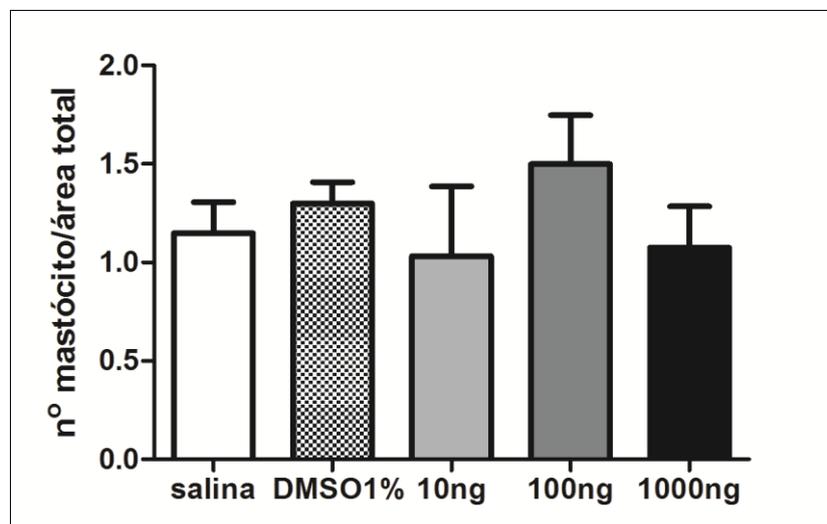


Gráfico 3: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sobre a o número de mastócitos no tecido fibrovascular: O tratamento não alterou o infiltrado de mastócitos nas doses avaliadas em relação ao grupo salina.

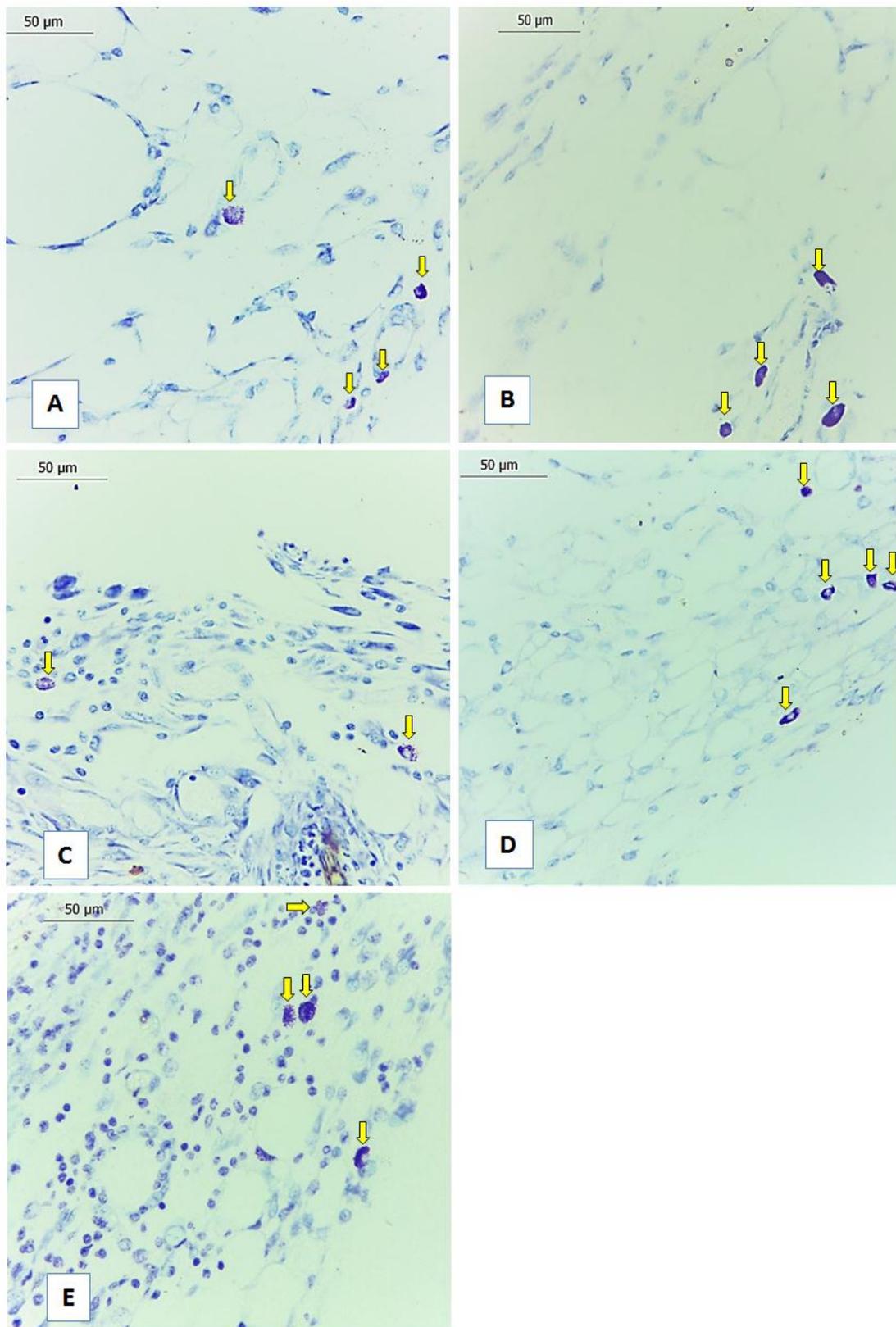


Figura 22: Cortes histológicos (5µm, coloração azul de toluidina) Infiltrado de tecido fibrovascular na matriz esponjosa dos implantes sintéticos em camundongos. Mastócitos estão presentes nesta matriz e são representados pelas setas. Grupo controle salina (A); grupo controle DMSO1% (B); grupo tratado com a dose de 10ng de *Casearia sylvestris* (C); grupo tratado com a dose de 100ng de *Casearia sylvestris* (D); grupo tratado com a dose de 1000ng de *Casearia sylvestris* (E). Nota-se uma maior tendência para aumento no número de mastócitos no grupo tratado com a dose de 100ng (E). Grupo experimental: n = 6 animais para cada grupo. Barra - 50µm.

9.2 - Efeitos do tratamento no componente angiogênico

O resultado da implantação da esponja é a formação de um tecido fibrovascular no material que permite a avaliação da angiogênese por diferentes técnicas. O componente angiogênico nos implantes foi avaliado pela dosagem do conteúdo de hemoglobina (método indireto - técnica de *Laser Doppler* - para análise de vasos recém formados) e pela quantificação de vasos sanguíneos em lâminas coradas com Tricrômico de gômori, fotografadas em microscópio de captura de imagens.

Em todos os parâmetros avaliados, o tratamento com a *Casearia sylvestris* não alterou significativamente o processo angiogênico, como mostrado na avaliação do conteúdo de hemoglobina pelo gráfico 4.

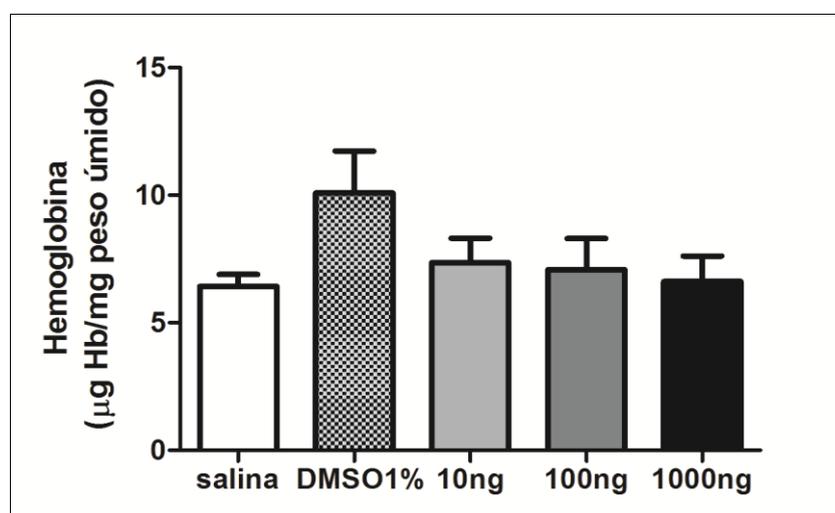


Gráfico 4: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sob a concentração de hemoglobina no implante sintético. O tratamento não alterou significativamente os níveis de hemoglobina nas doses avaliadas.

A quantificação de vasos sanguíneos relaciona a rede de vasos recém formados com a invasão de células do infiltrado inflamatório no tecido. As análises estatísticas, representadas no gráfico 5 mostram que tratamento com as doses de *Casearia sylvestris* não alterou significativamente o número de vasos quantificados na cápsula fibrovascular formada no implante de esponja. Esses resultados podem ser observados em cortes histológicos dos implantes na figura 23.

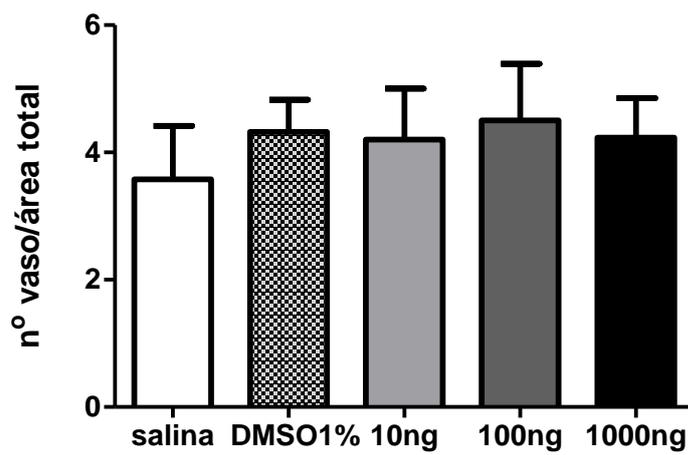


Gráfico 5: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sob o número de vasos avaliados no corte histológico do implante sintético. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

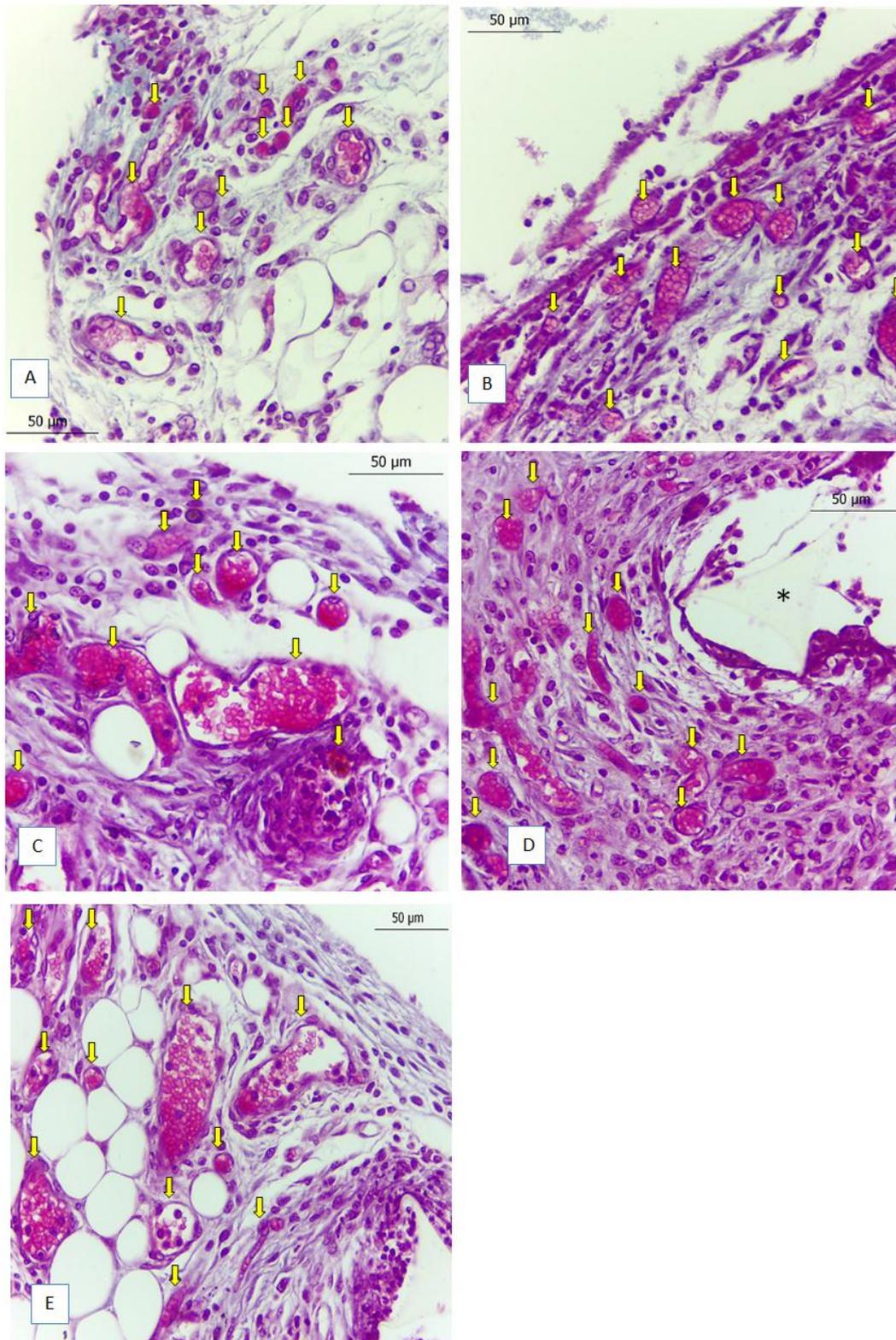


Figure 23: Cortes histológicas (5µm, coloração tricrômico de gômori) Infiltrado de tecido fibrovascular na matriz esponjosa dos implantes sintéticos em camundongos. Os vasos sanguíneos nesta matriz estão representados pelas setas. Grupo controle salina (A); grupo controle DMSO1% (B); grupo tratado com a dose de 10ng de *Casearia sylvestris* (C); grupo tratado com a dose de 100ng de *Casearia sylvestris* (D); grupo tratado com a dose de 1000ng de *Casearia sylvestris* (E). Grupo experimental n = 6 animais para cada grupo. Barra - 50µm. (*) representa a matriz sintética.

9.3 - Efeitos do tratamento no reparo tecidual

A fase de reparo foi avaliada pela dosagem bioquímica de colágeno solúvel (principal componente da matriz extracelular) presente nos implantes, quantificada com base colorimétrica pela reação do *Picrosirius Red* (gráfico 6).

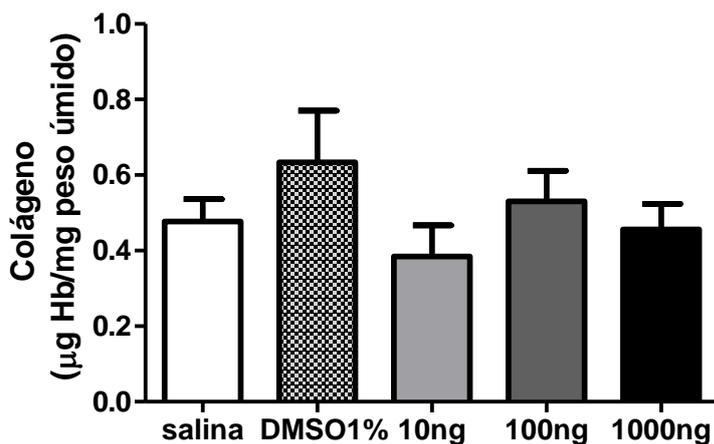


Gráfico 6: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sobre o colágeno depositado na matriz. Os tratamentos não mostraram diferença significativa entre os grupos.

O reparo foi avaliado, também, pela quantificação e caracterização morfológica de colágeno do tipo I e III em lâminas coradas com *Picrosirius Red*, fotografadas com microscópio de polarização. O tratamento de *Casearia sylvestris* não gerou alterações significativas na deposição de colágeno em relação ao grupo controle. (gráfico 7, figura 24).

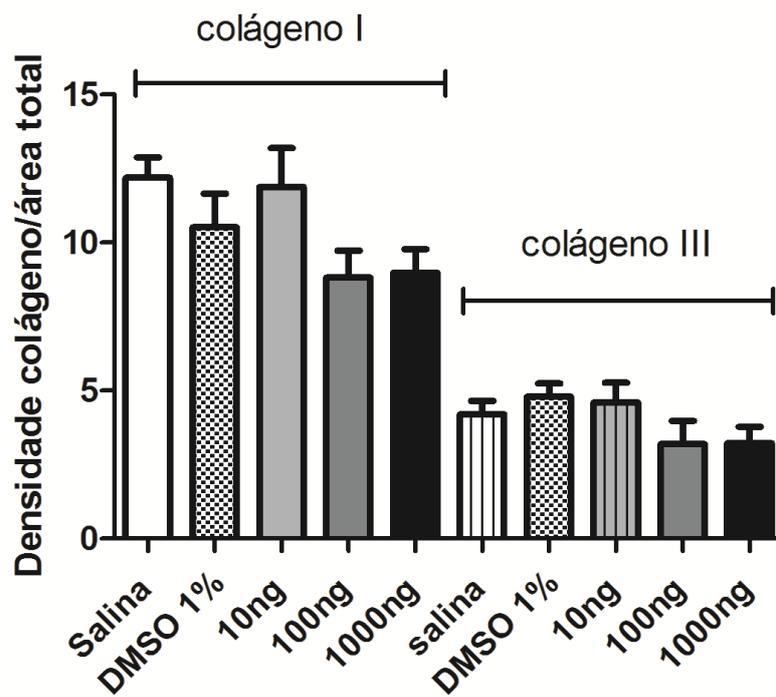


Gráfico 7: Efeito do tratamento com as doses de 10ng, 100ng e 1000ng do extrato bruto de *Casearia sylvestris* sobre o colágeno dos tipos I e III depositados na matriz. Os tratamentos não mostraram diferença significativa entre os grupos.

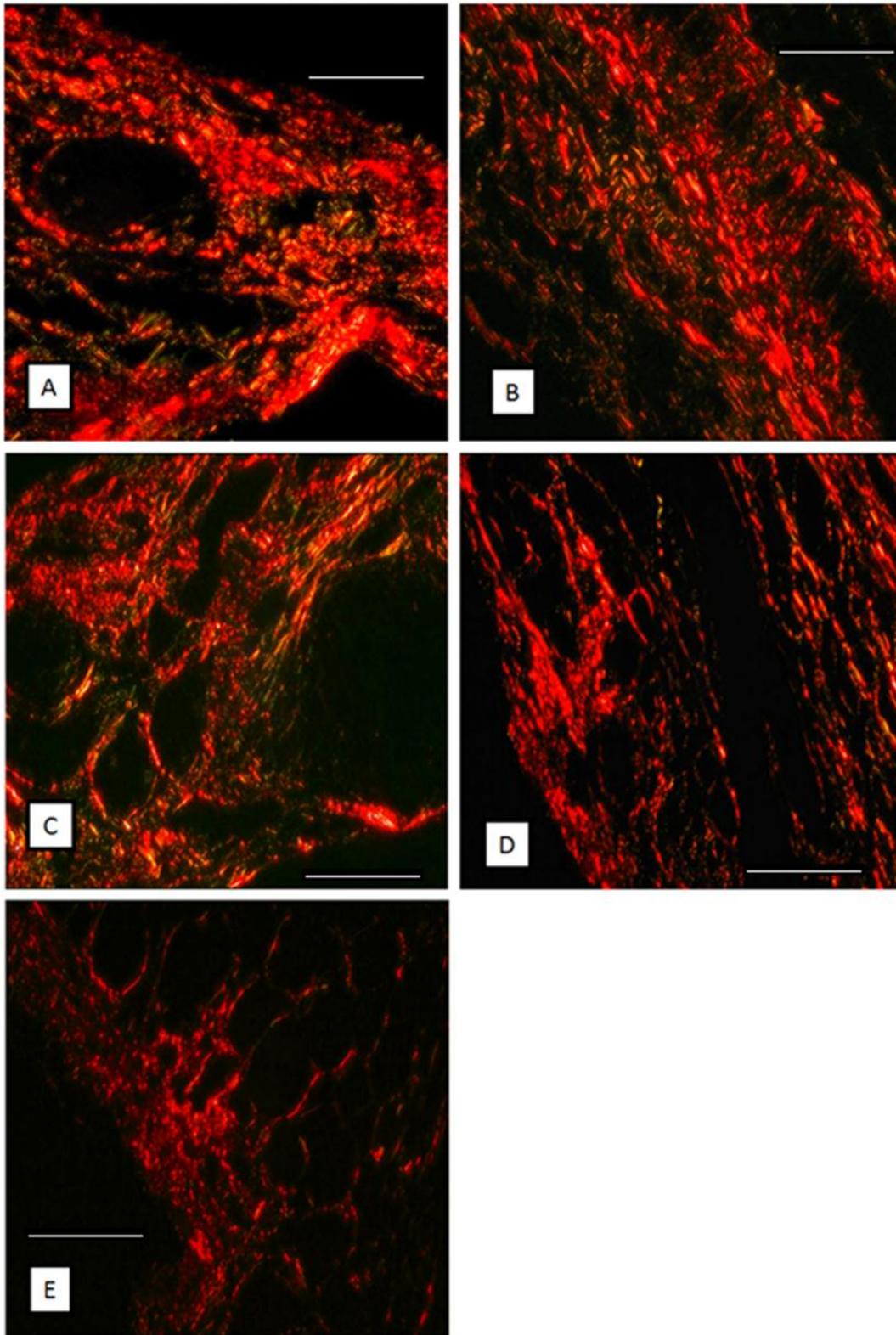


Figure 24: Cortes histológicos ($5\mu\text{m}$, coloração *Picrossirius Red*) Infiltrado de tecido fibrovascular na matriz esponjosa dos implantes sintéticos subcutâneos nos camundongos representado por feixes de colágeno. Grupo controle salina (A); grupo controle DMSO1% (B); grupo tratado com a dose de 10ng de *Casearia sylvestris* (C); grupo tratado com a dose de 100ng de *Casearia sylvestris* (D); grupo tratado com a dose de 1000ng de *Casearia sylvestris* (E). Nota-se uma maior tendência para aumento no número de mastócitos no grupo tratado com a dose de 100ng (E). Grupo experimental n = 6 animais para cada grupo. Barra - $50\mu\text{m}$.

10 - Discussão

Usos populares e pesquisas científicas têm destacado a importância dos extratos da *Casearia sylvestris* e seu grande potencial farmacológico representado por compostos bioativos tais como flavonas, saponinas, taninos, resinas e anticianosídeos e óleos essenciais. Essas propriedades bioativas são amplamente difundidas na medicina tradicional como agentes de ação depurativa, anti-diarreica, febrífuga, cardiotônica, diurética, analgésica, cicatrizante, e enfatizadas pela sua ação anti-inflamatória (MARQUES *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2011; TININIS, 2006). Tais propriedades são enfatizadas por substâncias encontradas no óleo essencial, presente nas folhas da *Casearia sylvestris* e popularmente atraídas pelo seu tratamento prático, econômico e de fácil preparação (FERREIRA *et al.*, 2011).

Ao avaliar a composição do extrato bruto obtido das folhas de *Casearia sylvestris*, constatou-se que este é representado por 24 compostos. Dentre eles, o componente majoritário é um sesquiterpeno, chamado de α -zingibereno (FELIPE, 2014; BOU, *et al.*, 2013, TININIS, 2006), que consiste numa classe química característica por seus efeitos anti-inflamatórios (FELIPE, 2014; BOU, *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2011). O conhecimento sobre o uso da *Casearia sylvestris* na medicina popular como um agente anti-inflamatório é justificado pela presença desses compostos que foram fitoquimicamente caracterizados e avaliados em estudos científicos anteriores. Entretanto, até o presente momento as pesquisas são insuficientes para garantir a segurança de preparações populares à base de *Casearia sylvestris* e não há nenhum medicamento fitoterápico com registro vigente na ANVISA obtido a partir dessa planta, apesar das várias propriedades farmacológicas descritas na literatura (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Com base nesses dados, foi postulada a hipótese sobre o real efeito anti-inflamatório dessa planta, extrapolando-se para um modelo que envolve uma típica inflamação crônica.

O presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da *Casearia sylvestris* na inflamação crônica sob o modelo experimental, no qual a matriz sintética (esponja) induz a inflamação crônica, tipo corpo estranho, estimulando a formação de um tecido fibrovascular. Este tecido fibrovascular recém-formado permite a infiltração e análise de componentes inflamatórios, angiogênicos, bem como o componente fibrogênico que

compõe a fase de reparo tecidual. Dentro desta perspectiva, este modelo viabiliza a análise desses parâmetros por meio do uso de compostos que exibem potenciais terapêuticos.

Neste trabalho, a *Casearia sylvestris* (administrada nas doses de 10ng, 100ng e 1000ng, com concentrações de 0,3µg/Kg, 3µg/Kg, 30µg/Kg respectivamente, administradas em um volume de 10µL injetados com seringas de 30µL, diretamente nos implantes subcutâneos de camundongos), não apresentou alterações significativas sobre o componente inflamatório, angiogênico e na fibrogênese em nenhum dos tratamentos utilizados comparados ao grupo controle salina. A avaliação histológica de cortes a partir dos implantes de esponja confirmou os resultados do tratamento sobre esses componentes do tecido fibrovascular induzido pela matriz esponjosa em todas as doses avaliadas.

Infiltrado inflamatório

O componente inflamatório foi avaliado pela atividade de enzimas inflamatórias presentes no implante (MPO e NAG) e pela quantificação de mastócitos em cortes histológicos. A atividade de MPO (representando neutrófilos ativados) e NAG (representado por macrófagos ativos), bem como o número de mastócitos presentes no tecido fibrovascular não foram afetados pelos tratamentos, mostrando ausência de efeito anti-inflamatório da *Casearia sylvestris* sobre estas populações de células inflamatórias.

Esteves *et al.* (2005) realizou um teste que induziu a formação do tecido granulomatoso (apresentação distinta de inflamação crônica, caracterizada pela formação de granulomas, que consiste numa aglomeração de células de defesa na tentativa de conter o agente agressor) e constatou que o extrato bruto de *Casearia sylvestris* (125mg/Kg; via oral) não inibiu significativamente este processo. Estes dados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, cujo infiltrado de células inflamatórias não foi alterado pelos tratamentos com as diferentes doses de *Casearia sylvestris*. Neste mesmo trabalho, Esteves *et al.* (2005), avaliaram a formação de edema na pata de ratos utilizando Dextran que é um agente inflamatório conhecido por induzir o edema mediado pela liberação de histaminas (Katz *et al.*, 1984), conseqüente à desgranulação de mastócitos (Lo *et al.*, 1982). A formação do edema acontece em virtude do aumento da permeabilidade vascular por meio da liberação destas substâncias produzidas pelo organismo após uma injúria (JONES, 2000). No entanto, os resultados

confirmaram que o extrato bruto de *Casearia sylvestris* (125mg/Kg; via oral) não apresentou efeito anti-edematogênico, (ESTEVES *et al.*, 2005), provavelmente devido a incapacidade da *C sylvestris* de antagonizar mastócitos e desgranulação de substâncias farmacológicas ativas (histamina e serotonina, por exemplo) (FERREIRA, 2011). Em conformidade com os resultados de Esteves *et al.* (2005), o presente trabalho sugere que o extrato bruto de *Casearia sylvestris*, nas doses avaliadas (0,3µg/Kg, 3µg/Kg e 30µg/Kg, não inibiram a resposta inflamatória.

Angiogênese

A formação do tecido fibrovascular presente na matriz sintética permite a análise do componente angiogênico durante o processo inflamatório crônico (CASSINE-VIEIRA, 2014; ARAUJO, 2010; ANDRADE *et al.*, 1987). A angiogênese é uma etapa do processo de reparo, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes (GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Sua importância se deve à sua participação na formação do tecido de granulação provisório e no suprimento de nutrientes e oxigênio para o tecido em crescimento (FOLKMAN & SHING, 1992; DE MENDONÇA *et al.*, 2009; GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Além disso, as células inflamatórias requerem a interação e transmigração (diapedese) por meio de vasos sanguíneos para entrarem no local da lesão (LI *et al.*, 2003). A angiogênese relaciona-se com uma sequência de eventos de grande importância em processos fisiológicos e patológicos. E a patologia, na maioria das vezes, associa-se com a formação exacerbada de novos vasos e, efeitos benéficos podem ser conseguidos com terapêuticos de ação inibitória da angiogênese (GRIFFOEN & MOLENA, 2000). Neste estudo, a avaliação da formação de neovasos foi realizada pela dosagem dos níveis de hemoglobina presente no infiltrado fibrovascular do implante sintético, bem como pela análise histológica de cortes corados com tricrômico de gômori para contagem de vasos sanguíneos. Porém, os resultados demonstraram que a *Casearia sylvestris* não alterou significativamente os níveis de hemoglobina em nenhuma das doses avaliadas, comparadas com o grupo salina. Com relação ao número de vasos presentes nos cortes histológicos, também não foram observadas alterações significativas nos tratamentos analisados.

Fase de reparo

A fase de reparo foi analisada pela deposição de colágeno no tecido fibrovascular dos implantes. Os resultados mostraram que o extrato bruto de *Casearia sylvestris*, administrado por injeção direta no implante sintético, não gerou alteração no perfil de deposição de colágeno no tecido fibrovascular. Como era de se esperar, no final da fase de reparo, os grupos apresentaram predominância de colágeno do tipo I (colágeno maduro) em relação ao colágeno do tipo III. No entanto, os grupos tratados não se diferem estatisticamente do grupo controle.

Em corroboração com o presente resultado, Lipinski *et al.* (2013), em sua pesquisa com feridas em novilhas de gado, tratadas por injeção via local com o extrato da *Casearia sylvestris*, apresentaram atividade anti-inflamatória, exibindo um efeito anti-edematoso nos primeiros 2 dias de tratamento. Entretanto, em avaliações microscópicas, os resultados não tiveram diferenças estatísticas quando comparados com o grupo controle. Os autores observaram que a retração da ferida foi mais lenta e, portanto, a *Casearia sylvestris* não melhorou o processo de reparo.

Estudos têm demonstrado resultados controversos sobre a ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris*. Ruppelt *et al.* (1991) analisaram a ação anti-inflamatória de 10 plantas semelhantes a *Casearia sylvestris* e observaram atividade reduzida para *Casearia sylvestris*. Ruppelt *et al.* (1991) analisaram a ação anti-inflamatória de 10 plantas semelhantes a *Casearia sylvestris* e observaram atividade reduzida para *Casearia sylvestris*.

Apesar de a ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris* ser difundida e evidenciada pela medicina popular, as doses utilizadas no presente trabalho (10ng, 100ng, 1000ng), via injeção local, sob o modelo de inflamação crônica induzida por implante sintético subcutâneo em camundongos, não apresentaram efeito na inflamação crônica.

Uma explicação plausível para tais resultados envolve a via de administração do tratamento - um importante parâmetro que se deve ter atenção, no que diz respeito ao potencial de ação da planta. A *Casearia sylvestris* pode ser explorada por meio da elaboração de creme para tratamento tópico ou injetado diretamente sobre a ferida, infusão para consumo oral (FERREIRA *et al.*, 2011; SASSIOTO *et al.*, 2004); administração subcutânea e intraperitoneal, (ARAUJO, *et al.*, 2015). Numa pesquisa

realizada por Ferreira e colaboradores (2011), eles identificaram e relacionaram a ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris* em sua maioria pela administração via oral (Tabela3).

Tabela 3: Uso popular da *Casearia sylvestris* em alguns países.

Uso popular da <i>Casearia sylvestris</i> em alguns países			
Parte da planta/País	Uso terapêutico tradicional	Preparação/Administração	Referência
Casca/Peru	Diarréia	Extrato aquoso/oral	Duke & Vasquez (1994)
Casca/Brasil	Febre Anti-inflamatório Diarreia Picada de cobra	Decocção/oral Decocção/oral Infusão da casca/tópico maceração/oral	Brandão <i>et al</i> (1985) Hirschmann & De Arias (1990) Ruppelt <i>et al</i> (1991) Duke & Vasquez (1994)
Folhas/Brasil	Febre Picada de cobra, herpes Estimulante sexual Sedativo Anti-inflamatório	Decocção/oral Decocção/oral Decocção/oral Decocção/oral Decocção/oral	Brandão <i>et al</i> (1985) Hirschmann & De Arias (1990) Hirschmann & De Arias (1990) Simões <i>et al</i> (1990) Simões <i>et al</i> (1990)
Folhas/Índia	Picada de cobra	Infusão	Selvanayahgam <i>et al</i> (1994)
Folhas/Colômbia	Úlcera	Extrato aquoso, tópico	Garcia-Barriga (1975)
Várias partes, Bolívia	Analgésico Anti-inflamatório Cicatrização Picada de cobra	Vários, oral	Baya (2001)
Raízes/Brasil	Dor Feridas, lepra	Decocção/oral maceração/oral	Hirschmann & De Arias (1990) Duke & Vasquez (1994)
Semente/ Brasil	Lepra	Óleo, tópico	Duke & Vasquez (1994)

Possivelmente, a administração via oral (FERREIRA *et al.*, 2011 e SASSIOTO *et al.*, 2004), do extrato dessa planta, gera o efeito anti-inflamatório esperado, visto que, a metabolização da planta no fígado pode gerar metabólitos ativos com efeito anti-inflamatório.

Além disso, Camargo *et al.* (1996) indicaram que a *Casearia sylvestris* pode apresentar diferente comportamento de acordo com a forma de preparo. Neste estudo, os autores observaram que o extrato alcoólico de *Casearia sylvestris* em pH 5,58 prolongou a fase aguda do processo inflamatório o que resultaria em um atraso no

evento regenerativo, enquanto que, em solução tamponada com pH 7,18 reduziu a fase aguda do processo inflamatório.

Outro parâmetro que pode interferir nos resultados, que dizem respeito à ação anti-inflamatória da planta são as doses utilizadas nos tratamentos. A maioria dos estudos relatados foi baseada em doses com concentrações maiores do extrato de *Casearia sylvestris* comparadas às doses utilizadas no presente trabalho. Albano *et al.* (2013) realizaram um experimento com a concentração de 100mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Casearia sylvestris* e observaram que a planta teve efeito redutor na resposta inflamatória induzida por carragenina em modelo de pleuresia em ratos. No entanto, Esteves *et al.* (2005) realizou um teste que induziu a inflamação crônica na pata de ratos e constatou que o extrato bruto de *Casearia sylvestris* na concentração de 125mg/Kg, administrada via oral, não inibiu significativamente este processo.

Sendo assim, os resultados apresentados pela atual pesquisa revelaram que as três doses avaliadas no presente trabalho (concentrações iguais a 0,3µg/Kg, 3µg/Kg, 30µg/Kg) não demonstraram efeito inibitório sob a inflamação crônica induzida por implante sintético, sugerindo que as doses podem interferir na eficácia e ação da planta.

Estes resultados são importantes para a caracterização da ação da *Casearia sylvestris*, a partir do seu extrato bruto (ESTEVES *et al.*, 2005) uma vez que a maior parte das investigações relacionadas com a atividade anti-inflamatória da guaçatonga está associada principalmente a extratos hidroalcoólicos da planta, como pode ser observado nos trabalhos de Da silva *et al.* (2008); Cavalcante *et al.*, (2007); Mosaddick *et al.* (2004); Orberlies *et al.* (2002); Basile *et al.* (2001); Borges *et al.* (2000); Carvalho *et al.* (1998) e Morita *et al.* (1991). A análise do potencial a partir do extrato de *Casearia sylvestris* sobre um modelo de inflamação crônica pode ajudar na explicação da atividade anti-inflamatória associada ao uso popular da planta.

11 – Conclusão

A *Casearia sylvestris* é nomeada pelo Ministério da Saúde como uma das espécies com potencial terapêutico, cujo valor medicinal dos seus extratos e compostos isolados é ressaltado pelo seu potencial farmacológico popularmente conhecido (FERREIRA *et al.*, 2011).

Apesar de a ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris* ser difundida e evidenciada pela medicina popular, as doses utilizadas no presente trabalho (10ng,

100ng, 1000ng), via injeção local, sob o modelo de inflamação crônica, induzida por implante sintético subcutâneo em camundongos, não apresentaram alterações significativas sobre os componentes avaliados (inflamatório, angiogênico e na fibrogênese do tecido recém-formado) em nenhum dos tratamentos utilizados comparação com o grupo controle salina, e, portanto, não exibiu efeitos anti-inflamatórios na inflamação crônica.

Acredita-se que a presente pesquisa contribui cientificamente na compreensão da atividade do extrato de *Casearia sylvestris* sob um modelo experimental que envolve a inflamação crônica e sugere que o extrato da planta seja investigado em outras formas de administração local (pomada) ou oral, pois, os componentes deste extrato podem apresentar classes de substâncias anti-inflamatórias que agem por diferentes mecanismos de ação. Além disso, sugere-se que as dosagens sejam avaliadas em outras concentrações de modo que as mesmas sejam ajustadas adequadamente para avaliação do processo.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Afsar U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274-281, 2011.
- ALBANO, Micheline N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw.(Salicaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.
- ALMEIDA-LOPES, Luciana. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. **São José dos Campos, SP**, 1999.
- AMORIM, J. N. C. **Patologia Humana**. Unidade de Educação a Distância-Newton. 2014. 91p
- ANDRADE, S. P.; FAN, T. P.; LEWIS, G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British journal of experimental pathology**, v. 68, n. 6, p. 755, 1987.
- ARAÚJO, F. A. et al. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 29-34, 2010.
- ARÁUJO, Éverton José Ferreira de et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 361, 2015.
- BASILE, A. C. et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-197, 1990.
- BONETTI YOSHIDA, Winston. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, n. 4, 2005.
- BORGES, M. H. et al. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.
- BORGES, Márcia H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A 2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.
- BOU, Diego Dinis et al. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound α -zingiberene and derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9477-9487, 2013.
- CASSINI-VIEIRA, Puebla et al. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicon**, v. 92, p. 81-89, 2014.

CAPOBIANGO, Rafael Aguiar; VESTENA, Silvane; BITTENCOURT, Alexandre Horácio Couto. Allelopathy of *Joanesia princeps* Vell. and *Casearia sylvestris* Sw. on the cultivated species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 924-930, 2009.

CARVALHO, P. E. R. Cafezeiro-do-Mato-*Casearia Sylvestris*. **Embrapa Florestas. Circular técnica**, 2007.

CAVALCANTE, Walter LG et al. Neutralization of snake venom phospholipase A 2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.

CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. L.: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181, 2015.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA SILVA, Saulo L. et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA 2 activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 2008.

DA SILVA, Saulo L. et al. Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008.

DA SILVA, Thais Horta Álvares et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese- Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, 2007.

DE CAMPOS, Evandro P. et al. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 269, 2015

DE CARVALHO, Paulo Roberto F. et al. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

DE MENDONÇA, Ricardo José; COUTINHO-NETTO, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

DE AZEVEDO CALDERON, Leonardo; DA SILVA, Luiz Hildebrando Pereira; STÁBELI, Rodrigo Guerino. Biodiversidade infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da amazônia legal. **Revista de Estudos Universitários-REU**, v. 36, n. 3, 2010.

DENIPOTI, Carlos Henrique; DE MORAES, Solange Marta Franzói; HERNANDES, Luzmarina. Angiogênese e exercício. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 11, n. 1, p. 17-22, 2013.

DI ROSA, M. L.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 126-134, 2012.

ROBBINS, S. L.; ANGELL, M.; KUMAR, V.. **Patologia básica**. Atheneu Ed., 1986.

ESTEVES, Iracema et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1, p. 191-196, 2005.

FELIPE, Karina Bettega et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1492-1499, 2014.

FELIPE, Karina Bettega et al. Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de *Casearia sylvestris* e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio. 2014.

FERREIRA, Paulo Michel P. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. **Regulation of Angiogenesis in Health and Disease**. The journal of biologic, 1992. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/267/16/10931.long>>. Acesso em: 23 Mar 2015.

FRANÇA, Inácia Sátiro Xavier de et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GENSEL, John C.; ZHANG, Bei. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain research**, v. 1619, p. 1-11, 2015.

GRIFFIOEN, Arjan W.; MOLEMA, Grietje. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 2, p. 237-268, 2000.

GUO, Shujuan; DIPIETRO, Luisa A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GUSMAN, Grasielle S. et al. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

HART, David A. Curbing Inflammation in Multiple Sclerosis and Endometriosis: Should Mast Cells Be Targeted? **International journal of inflammation**, v. 2015, 2015.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). Revista científica Nature Communications, 2015. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2296&sid=32&tpl=printerview>>. Acesso em: 22 Abr 2015.

ISAAC, Cesar et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010.

JACKSON, Jeffrey R. et al. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 6, p. 457-465, 1997.

J JONES, Thomas Carlyle; HUNT, Ronald Duncan; THOMAS CARLYLE JONES, Ronald Duncan Hunt. **Patologia veterinária**. 1984.

KATZ, LAURENCE B. et al. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 230, n. 3, p. 670-677, 1984.

KOH, Timothy J.; DIPIETRO, Luisa Ann. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, p. e23, 2011.

KOCH, Miriam; ZERNECKE, Alma. The hemostatic system as a regulator of inflammation in atherosclerosis. **IUBMB life**, v. 66, n. 11, p. 735-744, 2014.

KULCHETSCKI, Luiz; QUAQUARELLI, César Augusto; LIMA, Pedro Ribeiro. A guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.) e seu uso potencial como fitoterápico: um resultado prático de trabalho extensionista no distrito de itaiacoca. **Revista Conexão UEPG**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

LIBBY, Peter. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition reviews**, v. 65, n. suppl 3, p. S140-S146, 2007.

LIMA, Rafael Rodrigues et al. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LIPINSKI, Leandro Cavalcante et al. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**, v. 9, n. 4, p. 542-547, 2012.

LOWELL, Clifford A.; MAYADAS, Tanya N. Overview: studying integrins in vivo. **Integrin and Cell Adhesion Molecules: Methods and Protocols**, p. 369-397, 2012.

LI, Jie; ZHANG, Yan-Ping; KIRSNER, Robert S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 1, p. 107-114, 2003.

LO, THERESA N.; ALMEIDA, ALVAIR P.; BEAVEN, MICHAEL A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982.

LUCAS, Tina et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3964-3977, 2010.

MARAGOUDAKIS, Michael E. (Ed.). **Angiogenesis: models, modulators, and clinical applications**. Springer Science & Business Media, 2013.

MARQUES, Lana Grasiela Alves et al. Desenvolvimento do potencial tecnológico de *Casearia sylvestris*. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 4, p. 070-085, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf> Acesso em: 07 Abr 2015.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 1-11, 1991.

MORITA, H. et al. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693, 1991.

MOSADDIK, M. Ashik et al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 461-466, 2004.

OBERLIES, Nicholas H. et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

O'BYRNE, Kenneth J.; DALGLEISH, Angus G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **British journal of cancer**, v. 85, n. 4, p. 473, 2001.

OLCZYK, Pawel; MENCNER, Łukasz; KOMOSINSKA-VASSEV, Katarzyna. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

PHILLIPS, Charlotte L. et al. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney international**, v. 62, n. 2, p. 383-391, 2002.

PLUNKETT, Marian L.; HAILEY, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 62, n. 4, p. 510-517, 1990.

PULLI, Benjamin et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013.

SILVA, Saulo Luís da et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

ROMAN, Raquel Melchior; WENDLAND, Andrea Elisabet; POLANCZYK, Carisi Anne. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 91, n. 1, p. e12-e19, 2008.

SASSIOTO, Maria Cristina Pita et al. Effect of *Casearia sylvestris* on bone repair with devitalized bovine bone matrix in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SENGER, Donald R.; DAVIS, George E. Angiogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a005090, 2011.

SILVA, Thais Horta Álvares da et al. Angiogenesis inhibitors antitumor agents: pharmacophore models to an3 antagonists. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 2007.

SILVA, Fabiane Bortoluci da; ALMEIDA, Juliano Milanezi de; SOUSA, Simone Maria Galvão de. Natural medicaments in endodontics: a comparative study of the anti-inflammatory action. **Brazilian oral research**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

TININIS, A. G. et al. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

TOMIOSSO, Tatiana Carla et al. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell and tissue research**, v. 337, n. 2, p. 235-242, 2009.

WATSON, T. **Soft tissue repair and healing review, Tissue Repair**. 2012. Disponível em: <<http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review>>. Acesso em: 18 Jul 2014.

WERLE, Almeci LB et al. Evaluation of the activity of *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) on rats serum triglyceride. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 400-402, 2009.

WILGUS, Traci A. Growth factor–extracellular matrix interactions regulate wound repair. **Advances in wound care**, v. 1, n. 6, p. 249-254, 2012.

WILLIAMS, Marcie R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in immunology**, v. 32, n. 10, p. 461-469, 2011.

WITTE, Maria B.; BARBUL, Adrian. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 4, p. 406-412, 2002.

YUSSOF, Shah Jumaat Mohd et al. Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 220, 2012.

ZGHEIB, Carlos; XU, Junwang; LIECHTY, Kenneth W. Targeting inflammatory cytokines and extracellular matrix composition to promote wound regeneration. **Advances in wound care**, v. 3, n. 4, p. 344-355, 2014.

