UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE *Copaifera langsdorffii* NO REPARO DE FERIDA CIRÚRGICA NA PRESENÇA DE UM CORPO ESTRANHO

Rafael Costa Vieira

Orientador: Profº. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

GOIÂNIA
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

RAFAEL COSTA VIEIRA

INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE *Copaifera langsdorffii* NO REPARO DE FERIDA CIRÚRGICA NA PRESENÇA DE UM CORPO ESTRANHO

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal junto à Escola
de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás

Área de concentração:
Patologia Clínica e Cirurgia

Orientador:
Profº. Dr. Luiz Augusto Batista Brito
Comitê de Orientação:
Profª. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis
Profª. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA
2007

RAFAEL COSTA VIEIRA

Dissertação defendida e aprovação em _____ de _____ de _____,
pela seguinte Banca examinadora:

_____

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito – EV/UFG
Presidente da Banca

_____

Prof. Dr. Raimundo Alberto Tostes – UME/PR

_____

Profª. Drª. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura – EV/UFG

dedico

à minha querida mãe,
Maria Madalena Costa Vieira.
sem medir esforços você fez
da minha educação a minha
maior virtude.

AGRADECIMENTOS

À Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis, professora e pesquisadora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e co-orientadora deste projeto. Obrigado pela atenção sempre. Obrigado pelos conhecimentos transmitidos e por não ter medido esforços para ajudar a desenvolver este trabalho. Obrigado também por ter sido uma grande amiga e uma companheira nos momentos de incerteza. Obrigado por ter estabelecido prazos, por ter cobrado quando necessário, por ter corrigido os erros e por ter ensinado a querer sempre acertar. Obrigado pela compreensão nos momentos que me ausentei, mas principalmente, obrigado por querer meu crescimento e por colaborar com ele. Nesses dois anos, você se mostrou muito mais que uma orientadora, marcou a minha história e tornou-se exemplo de profissional. A você um muitíssimo obrigado.

Ao Dr. Luiz Augusto Batista Brito, professor e pesquisador da Escola de Veterinária, meu orientador e um grande incentivador da minha decisão de entrar para o programa de pós-graduação. Muitíssimo obrigado por ter participado das minhas escolhas e por ter colaborado para o desenvolvimento deste projeto. Mas principalmente pela atenção nos momentos em que foi solicitado.

Ao Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, professor e pesquisador do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, por ter sido um grande colaborador no desenvolvimento desse trabalho e por ter dedicado tantas horas nas avaliações microscópicas. Mas acima de tudo, por ter contribuído para o meu conhecimento.

À Drª. Maria Clorinda Soares Fioravanti, professora e pesquisadora da Escola de Veterinária, pelos conselhos e colaborações quando era solicitada.

À Drª. Heloisa Helena Garcia da Silva, professora e pesquisadora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, por ter fornecido o extrato da planta.

À Drª. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera, coordenadora do Biotério Central da UFG, pela contribuição ética para o desenvolvimento da pesquisa com os animais e por ser uma das responsáveis pelo meu apego à ciência. Mas principalmente, por ter transmitido parte do seu vasto conhecimento e por mostrar-me o verdadeiro valor dos animais de experimentação.

À técnica do Laboratório de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Vânia Beatriz Lopes Moura, pela contribuição espontânea e por ter auxiliado tanto na confecção das lâminas histológicas.

Aos alunos de graduação da Escola de Veterinária, Cynthia Viana, Ethiane Bombardieri e Julierme Oliveira, pela colaboração fundamental no desenvolvimento das atividades laboratoriais e pela amizade.

Aos colegas de laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas, Arioldo Júnior, Aurélio Rodovalho, Bruna Daniella, Cristina Almeida, Ediane Batista, Eduardo de Sousa, Izaias Júnior, João Alves, Loanda Limongi e Michelle Guerreiro, pela boa convivência, solidariedade e amizade.

A todos os colegas do programa de pós-graduação da Escola de Veterinária, companheiros nos aprendizados, nas dúvidas, nos bons e maus momentos, e pela ajuda mútua no decorrer desse período.

Aos colegas de trabalho, professores do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, por transmitir experiências e contribuírem para meu crescimento profissional.

Aos meus alunos, com os quais aprendo muito, por serem os principais estimuladores da minha vida profissional.

À CAPES por ter concedido uma bolsa de estudo durante todo período de pós-graduação.

Aos amigos, Carlo Batistella, Luana Batistella e Marcelo Vieira, pelo apoio, atenção e solidariedade durante nossos longos anos de convivência. E também por terem contribuído nas correções ortográficas.

Aos meus pais Antônio de Jesus Vieira e Maria Madalena Costa Vieira, pela vida, amor e dedicação e aos meus queridos irmãos Marco Aurélio e Alexandre por compreenderem minha ausência e por apoiarem minhas decisões.

E finalmente aos animais, que foram instrumentos de aprendizado e deram suas vidas em benefício da ciência.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1 O cerrado e suas plantas medicinais..... 3
2.2 As copaibeiras..... 4
2.3 O óleo de copaíba para fins terapêuticos..... 6
2.4 Inflamação..... 8
2.4.1 Introdução geral..... 8
2.4.2 O tecido conjuntivo é o substrato anatômico da resposta inflamatória..... 9
2.4.3 As alterações vasculares..... 10
2.4.4 Os mediadores inflamatórios..... 10
2.4.5 Moléculas de adesão que participam do extravasamento de células..... 12
2.4.6 Migração leucocitária para o tecido lesado..... 14
2.4.7 Neutrófilos..... 15
2.4.8 Monócito..... 17
2.4.9 Mastócito..... 19
2.4.10 Plaquetas..... 19
2.5 Reparo e cicatrização do tecido..... 20
2.5.1 Fase inflamatória..... 20
2.5.2 Fase fibroblástica ou proliferativa..... 23
2.5.3 Fase de remodelação..... 24
2.5.4 Reparo ou regeneração do panículo carnoso..... 24
2.6 Fatores que influenciam no processo de reparação tecidual..... 26
2.7 Uma reação inflamatória para corpo estranho..... 27
3 OBJETIVOS..... 31
3.1 Objetivo geral..... 31
3.2 Objetivo específicos..... 31
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 32
4.1 Escolha e obtenção da planta medicinal..... 32
4.2 Seleção e aclimatização dos animais..... 32
4.3 Padronização dos grupos de tratamentos..... 32

4.4 Divisão dos grupos experimentais..... 33
4.5 Contenção e anestesia dos animais..... 34
4.6 Implante das lamínulas..... 34
4.7 Extração das lamínulas e coleta do material para histopatológico..... 34
4.8 Montagem da lâmina do estudo de migração celular..... 35
4.9 Contagem das células no estudo de migração celular..... 35
4.10 Preparação das lâminas histológicas de pele..... 35
4.11 Avaliação macro e microscópica da pele..... 36
4.12 Análise estatística..... 36
5 RESULTADOS..... 37
5.1 Avaliação do processo de reparo do 1º ao 14º dia..... 37
5.2 Avaliação do perfil de migração celular para corpo estranho..... 53
5.3 Influência de diferentes tratamentos tópicos no perfil de migração celular.... 56
6 DISCUSSÃO..... 60
7 CONCLUSÕES..... 67
8 REFERÊNCIAS..... 68
9 ANEXOS..... 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 *Copaifera langsdorffii*..... 5
Figura 2 Fotomicrografias da pele de camundongos um dia após a incisão cirúrgica..... 38
Figura 3 Intensidade da necrose e crosta serocelular um dia após a incisão cirúrgica..... 39
Figura 4 Fotomicrografias da fase inflamatória do processo de reparo da pele de camundongos um dia após a incisão cirúrgica..... 40
Figura 5 Fotomicrografias da pele de camundongos três dias após a incisão cirúrgica..... 42
Figura 6 Fotomicrografias da pele de camundongos cinco dias após a incisão cirúrgica. 44
Figura 7 Intensidade do infiltrado inflamatório cinco dias após a incisão cirúrgica..... 45
Figura 8 Intensidade das alterações vasculares cinco dias após a incisão cirúrgica..... 46
Figura 9 Fotomicrografias da pele de camundongos sete dias após a incisão cirúrgica..... 48
Figura 10 Fotomicrografias do processo de reparo do panículo carnoso de camundongos sete dias após a incisão cirúrgica..... 49
Figura 11 Fotomicrografias da pele de camundongos quatorze dias após a incisão cirúrgica..... 51
Figura 12 Fotomicrografias do processo de reparo do panículo carnoso de camundongos quatorze dias após a incisão cirúrgica..... 52
Figura 13 Cinética de migração celular para corpo estranho..... 54
Figura 14 Avaliação do perfil de migração celular para corpo estranho..... 55
Figura 15 Perfil de migração celular para corpo estranho um dia após o implante..... 56
Figura 16 Cinética de migração de neutrófilos para corpo estranho do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento..... 57
Figura 17 Cinética de migração de macrófagos para corpo estranho do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento..... 58
Figura 18 Formação de células gigantes multinucleadas em corpo estranho, do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Avaliação dermatohistológica após um dia de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo..... 41

Tabela 2 Avaliação dermatohistológica após três dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo..... 43

Tabela 3 Avaliação dermatohistológica após cinco dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo..... 47

Tabela 4 Avaliação dermatohistológica após sete dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo..... 50

Tabela 5 Avaliação dermatohistológica após quatorze dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo..... 53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Fatores de crescimento envolvidos no reparo dos tecidos..... 22

Quadro 2 Distribuição dos animais nos diferentes grupos de tratamentos em cada um dos pontos experimentais correspondentes aos dias de extrações das lamínulas..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS

ASMA-α	Actina de Músculo Liso-α
CCL2	Ligante de Quimiocina CC-2
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTGF	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
endoCAM	Molécula de Adesão Celular do endotélio
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GlyCAM-1	Molécula de Adesão Celular Dependente de Glicolosação - 1
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos Macrófagos
HE	Hematoxilina e Eosina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular -1
ICAM-2	Molécula de Adesão Intracelular -2
IFN-γ	Interferon-γ
IGF-1	Fator de Crescimento como a Insulina-1
IL	Interleucina
LFA-1	Antígeno associado à função do linfócito - 1 (CD11a/CD18)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
Mac-1	Molécula de adesão celular CR3 ou CD11b/CD18
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócito-1
MDA	Malondialdeido
MIP-1α	Proteína Inflamatória do Macrófago-1α
MMP-2	Metaloproteinase-2
MPO	Mieloperoxidase
NRC	National Research Council
NGF	Fator de Crescimento de Nervo
NF-κB	Fator Nuclear- κB
PAF	Fator ativador de Plaquetas
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular
PGE_1	Prostaglandina E_1
PGE_2	Prostaglandina E_2
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PSGL-1	Glicoproetína da P-selectina - 1
SLe^x	Sialil-Lewis X
SHP-1	Motivo contendo o domínio SH-1 de ligação ao fosfato
SHP-2	Motivo contendo o domínio SH-2 de ligação ao fosfato
TGF-β1	Fator Crescimento Transformador - β1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - α
VCAM-1	Molécula de Adesão às Células Vasculares -1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VLA-4	Antígeno de Expressão Tardia

RESUMO

A *Copaifera langsdorffii* é uma leguminosa nativa do Brasil, da qual pode ser extraído um óleo resina, popularmente conhecido como óleo de copaíba. Este óleo é amplamente utilizado para tratamento de feridas cutâneas como antiinflamatório e cicatrizante. Apesar disso, poucas comprovações científicas do verdadeiro efeito terapêutico desta planta medicinal foram produzidas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento tópico com *C. langsdorffii* no processo de reparo e na atividade inflamatória quando um corpo estranho é o indutor da inflamação. Para isso, 120 camundongos da linhagem BALB/c foram submetidos à incisão cirúrgica linear de 1 cm no dorso, e uma lamínula de vidro circular com 12 mm foi implantada no espaço subcutâneo. Após o implante a incisão foi suturada com fio de nylon e tratada topicamente. Quatro tratamentos para a ferida foram estabelecidos: controle (C) solução salina estéril, controle veículo (CV) óleo mineral estéril, tratamento 1 (T1) tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii,* tratamento 2 (T2) tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro*.* Somente aos três dias foi possível perceber características da fase proliferativa como a reepitelização, a presença de fibroblastos e a neovascularização, porém os grupos tratados com o óleo (T1 e T2) não apresentavam reepitelização. Esses grupos, (T1 e T2), aos cinco dias também apresentavam na macroscopia maior intensidade de edema, hiperemia e permanência de crostas serocelular. Nos grupos C e CV, apesar de discreta, era predominante a presença de mononucleares, enquanto nos grupos T1 e T2 o infiltrado inflamatório era misto e de maior intensidade. Aos sete dias apesar de reepitelizada, a epiderme dos grupos T1 e T2 ainda estavam cobertas por crosta serocelular e o infiltrado inflamatório de células mononucleares continuava mais acentuado na derme. Quatorze dias após a incisão cirúrgica, os aspectos macroscópicos dos grupos C e CV eram semelhantes e os grupos T1 e T2, apesar de a ferida estar completamente fechada e sem crostas, a pele desses animais estava espessada. Além disso, a derme do grupo T2 parecia ter fibrose moderada, enquanto nos outros grupos era leve. Quanto ao perfil de migração celular para corpo estranho ao primeiro dia as células predominantes eram polimorfonucleares neutrófilos, com raros monócitos ou macrófagos. No entanto, quando as feridas cirúrgicas foram tratadas com óleo observou-se o aparecimento precoce de macrófagos (C= 7,21, CV= 18,57, T1= 19,17, T2= 23,76 $p<0,05$). Os perfis de migração celular nos outros pontos experimentais não foram alterados. Esses resultados demonstraram que o tratamento tópico com óleo de *C. langsdorffii* prejudicou o processo de reparação normal de uma ferida na presença de um corpo estranho.

Palavras chaves: Óleo de copaíba, cicatrizante, antiinflamatório

ABSTRACT

Copaifera langsdorffii is a Brazilian native leguminosae that produce resin-oil, popularly known as copaíba oil. This oil is used in the treatment of skin wound like antiinflammatory and wound healing. Despite, its popular use, there are few published data about the therapeutic effect of this medicinal plant. The aim of the study was to evaluate the topic treatment effect of the Copaíba oil on the process of skin repair and inflammation induced by a foreign body subcutanously implanted. 120 BALB/c mice were submitted to a 1 cm linear incision and one 12 mm circle coverslip was subcutaneously implanted. After implantation the surgical incision was sutured. Four treatments groups were established: control, sterile saline (C); vehicle control, sterile mineral oil, (VC); treatment 1 (T1), mineral oil plus copaiba oil (V/V), and treatment 2 (T2) copaiba oil. The evaluations were performed at pre-determined time points (1, 3, 5, 7 and 14 days). It was possible to find fibroblasts, epithelial cells proliferation, re-epithelization and newly formed blood vessels in all groups, however, all oil treated groups (T1 and T2) did not present re-epithelization at three days post surgical incision. On day fifth, a higher intensity of edema and hyperemia on the groups T1 and T2 was observed, besides that, the T1 and T2 groups presented a serous cellular scab on the wounds that was absent on the C and VC groups. The inflammatory reactions among the groups C and VC showed more mononuclear cells than the T1 and T2 groups that presented a mixed cell patter composed from both mono and polymorphonuclear cells. Although the surgical wounds were re-epithelizaded, in the groups T1 and T2, they were covered by a serous cellular crust and the dermis tissue still presented an intense mononuclear cell inflammatory focus. Fourteen days after of the surgical incision, the gross aspects on groups C and VC were similar and on groups T1 and T2, despite wound to be completely closed and without crusts, the skin those animals was thickened. Furthermore, the dermis on group T2 presented moderate fibrosis, while the other groups presented slightly ones. The cell migrations to the foreign body was changed only on the first day, while the predominant cells were neutrophils and rare monocyte or macrophage on the C group, the VC, T1 and T2 groups showed a higher percentage of macrophages in the coverslips (C= 7,21, VC= 18,57, T1= 19,17, T2= 23,76, $p<0,05$). The oil treatment did not change the cell migration to the foreign body on the next time points. The results demonstrated that topical treatment with *C. langsdorffii* oil debilitated the normal wound repair process in the presence of a foreign body.

Keywords: Copaiba oil, wound healing, anti-inflammatory

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras drogas são usadas na medicina alopática como antiinflamatórios e cicatrizantes. Com os avanços na biologia celular e molecular, essas drogas tornam-se cada vez mais eficientes. Paradoxalmente, na medicina alopática, estão disponíveis drogas capazes de alterar respostas fisiológicas, modificar vias metabólicas, bloquear receptores celulares, ou até mesmo, drogas produzidas a partir de DNA recombinante. Por outro lado, na medicina alternativa, as plantas medicinais, apesar de serem usadas de maneira cada vez mais abrangente e muitas vezes representarem o único recurso terapêutico de uma comunidade, têm o uso baseado apenas em conhecimentos populares, faltando o suporte de evidências experimentais que comprovem o potencial terapêutico, mecanismo de ação, toxicidade e os possíveis efeitos colaterais.

Apesar do óleo de *Copaifera langsdorffii* ser amplamente comercializado e indicado para tratamento de feridas, cientificamente pouco se sabe a respeito desse óleo dito “milagroso”. Poucos trabalhos são encontrados e nem todos trazem todas as informações necessárias, o que gera resultados duvidosos e controversos. Não bastasse a falta de conhecimento acerca do verdadeiro potencial terapêutico, outros problemas estão envolvidos na sua utilização como, por exemplo, a contaminação, a autenticidade e a mistura a outros óleos nas preparações comercializadas. Isso, além de alterar os efeitos esperados, pode colocar em risco a saúde dos consumidores.

A avaliação da atividade antiinflamatória, na maioria das vezes, é realizada através de dois testes. Um investiga a atividade antiinflamatória aguda, denominado *teste de edema de patas*, e outro a crônica, o *teste de implante de chumaço de algodão*. O estudo de migração celular para corpo estranho nunca fora utilizado com este propósito, porém levantamos a hipótese de que através dele seria possível investigar as duas fases da inflamação e ainda através da avaliação histológica da pele, poderíamos verificar a atividade cicatrizante.

Embora existam evidências consideráveis dos mecanismos inflamatórios e de reparo de um tecido, e também estejam bem definidas as fases desses processos, permanecem largamente inexplorados os mecanismos que envolvem o processo de migração celular para corpo estranho e o que regula a

retenção das células dentro de tecido inflamado, assim como a interação delas com um corpo estranho.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades cicatrizantes e antiinflamatórias do óleo de *Copaifera langsdorffii,* por meio dos exames macro e microscópico da pele, e também pelo perfil de migração celular para corpo estranho. Com os resultados visamos fornecer subsídios científicos acerca da utilização deste óleo no tratamento de feridas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cerrado e suas plantas medicinais

Uma estreita relação entre o homem e as plantas consideradas curativas sempre existiu em todas as fases do desenvolvimento das várias civilizações. Provavelmente, a tendência de utilizar plantas para tratamento dos males é inata aos homens e animais (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993). Como a busca por alimentos era um processo contínuo, foi através da observação dos efeitos que algumas plantas exerciam tanto sobre o organismo humano quanto animal, que as pessoas puderam desenvolver uma medicação herbácea própria para cada tipo de doença (STEIN, 1998).

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos, esses vegetais são prescritos com freqüência devido aos efeitos medicinais que produzem. Dessa forma, os usuários de plantas medicinais tornam válidas informações medicinais que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al. 2002). Estudos que visam a comprovação da autenticidade das informações populares estão sendo continuamente desenvolvidos, de forma que ao longo do tempo, uma gama de drogas de origem vegetal, inicialmente restritas ao uso popular e até mesmo consideradas tóxicas, estão sendo incorporadas ao arsenal terapêutico (FREIRE, 1992).

Estima-se em 1,5 milhões o número de espécies vivas no globo terrestre. Destas espécies, cerca de 300.000 estão incluídas no reino *Plantae* (MENTZ & BORDIGNON, 1999). O Brasil, com toda a sua riqueza natural, possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado, que ocupa mais de dois milhões de Km^2, que equivalem a 23,9% do território nacional. No Cerrado, mais de 170 famílias, 1.140 gêneros distribuídos e mais de 3000 espécies já foram identificados. Entretanto, essa flora ainda não está completamente conhecida, nem tão pouco os recursos terapêuticos oferecidos pelas plantas medicinais. Por esta razão, unidades de conservação, com áreas significativas, deveriam ser criadas e mantidas nas mais diversas

regiões do Domínio do Cerrado, a fim de garantir a preservação do maior número de espécies da flora deste Bioma, bem como da fauna a ela associada (GUARIM NETO & MORAIS, 2003; MACHADO, et al., 2004)

Segundo LAUREANO (1999), a região do Cerrado é rica em seu formulário popular. As plantas medicinais são reconhecidas e utilizadas pelas comunidades, e a ação medicamentosa das preparações caseiras é comprovada pelo uso popular. Os remédios caseiros preparados artesanalmente com as plantas medicinais do cerrado já revelam informações essenciais para os estudos de sua confirmação científica, cabendo aos pesquisadores aprofundarem os estudos sobre essas espécies que já são amplamente usadas, conferindo às mesmas, o selo de autenticidade científica.

2.2. As copaibeiras

As copaibeiras, conhecidas popularmente por dezenas de nomes, são comumente utilizadas na medicina alternativa. Elas são leguminosas da família *Caesalpiniaceae* e pertencem ao gênero *Copaifera,* onde 72 espécies estão distribuídas. Destas, 16 são encontradas apenas no Brasil, com destaque para *C. officinalis, C. guianensis, C. reticulata, C. multijuga, C. confertiflora, C. langsdorffii, C. coriacea e C. cearensis* (VEIGA Jr. & PINTO, 2002).

A *Copaifera langsdorffii* é uma árvore que atinge até 35 metros de altura, encontrada tanto em áreas de cerrado aberto como em áreas de florestas em vários estados brasileiros (BA, CE, ES, GO, MA, MG, MS, PB, PE, PI, PR, RJ, RO, SP, TO). Essa leguminosa apresenta floração nos meses de dezembro a março e frutifica em agosto e setembro. As flores são de coloração branca e os frutos são vagens secas de coloração marrom. Suas folhas são compostas, de coloração bem verde e nos meses secos algumas folhas são perdidas e posteriormente substituídas por novas com a tonalidade rosa (FREITAS & OLIVEIRA, 2002; LORENZI & MATOS, 2005). A Figura 1 apresenta a árvore de *C. langsdorffii,* suas folhas, flores, frutos, sementes e caule.

Observando a histologia do lenho da *C. langsdorffii*, MARCATI et al. (2001) encontraram canais axiais entre as células parenquimáticas formando espaços intercelulares grandes e longos. Esses canais têm capacidade secretora, estão presentes em todas as espécies do gênero *Copaifera* e são responsáveis pela produção de um óleo, o conhecido óleo de copaíba que, segundo VEIGA Jr. & PINTO (2002), trata-se de um produto de metabolismo secundário que atua na defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.

Figura 1 – *Copaifera langsdorffii.*
Fonte: (LORENZI & MATOS, 2005)

O óleo de copaíba é uma resina formada por ácidos resinosos e substâncias voláteis. Conforme ALONSO (1998), de 30 a 90% da composição são óleos voláteis compostos principalmente por sesquiterpenos tais como: β - bisaboleno, β - cariofileno, δ e γ - cadineno, α e β - copaeno, α - cubebeno, α e β - selineno, γ - muuroleno, β - cubeleno, aromadendreno, β - elemeno, humuleno, α - copaeno, cipereno. VEIGA Jr. & PINTO (2002), em uma vasta revisão de literatura, encontraram 72 sesquiterpenos diferentes e 27 ácidos diterpenos, como por exemplo, o ácido caurenóico, β-caurenóico e polialtico, isolados por FERRARI et al, (1971). VEIGA Jr. & PINTO (2002) também citam a presença de taninos, aminoácidos não protéicos, como o N-metil-4-hidroxiprolina e ácido copálico, este último presente em todos os óleos de copaíbas, servindo como biomarcador do gênero *Copaifera* em análises de autenticidade.

O óleo é um líquido transparente, com uma coloração variando do amarelo ao marrom e, somente na *C. langsdorffii,* o óleo apresenta-se vermelho, sendo, por essa característica, conhecida como “copaíba-vermelha”. A composição química, o aroma, a viscosidade, a coloração e o conteúdo de óleos voláteis podem variar muito entre as diferentes espécies de copaíbas. As diferenças entre as espécies podem estar relacionadas também com fatores ambientais, como sazonalidade, clima e solo. Assim, nem todas as plantas exsudam óleos com propriedades terapêuticas (PLOWDEN, 2004; VEIGA Jr. & PINTO, 2002).

2.3. O óleo de copaíba para fins terapêuticos

O óleo de copaíba e suas propriedades medicinais eram bastante difundidos entre os índios latino-americanos à época que aqui chegaram os primeiros exploradores europeus no século XVI. Os primeiros colonizadores relataram que as mulheres índias aplicavam este óleo no cordão umbilical dos recém-nascidos e os guerreiros, após as batalhas, em seus ferimentos. Este conhecimento, ao que tudo indica, veio da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras para cicatrizarem suas feridas (SALVADOR, 1975).

Como citado por VEIGA Jr. & PINTO (2002), estranhamente, esse óleo é utilizado para uma variedade de aplicações terapêuticas como: estimulante, diurético, laxativo, expectorante, bronquite, inflamações de garganta, pneumonia, sinusite, psoríase, dermatite, cicatrizante de feridas, antitetânico, anti-hemorrágico, anti-reumático, anti-ulcerogênico, antisséptico do aparelho urinário, antiinflamatório (BASILE et al., 1988) e mais algumas outras. Assim mesmo, diante de tantas aplicações terapêuticas desses óleos, os estudos farmacológicos descritos até o momento são escassos e a confiabilidade dos resultados também (MACIEL et al. 2002).

PAIVA et al. (1998) atribuíram ao óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* um efeito protetor da mucosa gástrica. Para isso, três grupos de ratos foram submetidos a condições que os provocaram desenvolvimento de úlceras gástricas (etanol, indometacina e estresse pelo frio excessivo). Aprofundando as

investigações, PAIVA et al. (2003) e PAIVA et al. (2004a) induziram a formação de colite através da aplicação de ácido acético em ratos e verificaram uma ação antiinflamatória potente, pois os níveis de mieloperoxidase (MPO), marcador do acúmulo de polimorfonucleares, e malondialdeido (MDA), um bom indicador de peroxidação lipídica, estavam diminuídos em animais tratados com *C. langsdorffii*. Nessas ocasiões, atribuiu-se a atividade antiinflamatória a um diterpeno, o ácido caurenóico (PAIVA et al., 2003) presente na *C. langsdorffii,* pois este ácido inibe a atividade de transcrição do Fator Nuclear- kB (NF-kB), uma importante molécula envolvida no processo de ativação celular na resposta imune inata (CASTRILLO et. al, 2001).

Ao ácido caurenóico do óleo da *C. langsdorffii* também foi atribuído o efeito protetor contra o dano tecidual provocado pela isquemia e reperfusão no intestino. A isquemia/reperfusão desperta uma resposta inflamatória complexa, envolvendo o sistema complemento, a marginação e agregação de polimorfonucleares e a produção de radicais livres, os quais são responsáveis pela injúria tecidual. PAIVA et al. (2004b) utilizaram doses orais ou intraretais do óleo resina de *C. langsdorffii* momentos antes de provocarem a isquemia/reperfusão e perceberam que os animais tratados previamente apresentaram diminuição significativa de MPO, MDA e também de nitritos. Assim, através desses resultados puderam concluir que o óleo resina de *C. langsdorffii* previne os danos causados ao tecido. Além disso, sugerem que este efeito pode ser, pelo menos em parte, devido às ações antioxidantes e anti-lipoperoxidativas.

BRITO et al. (1998) e BRITO et al. (1999), em seus experimentos avaliaram o efeito do óleo de C*opaifera reticulata* na cicatrização através de aplicação tópica em feridas de ratos e puderam perceber, na análise macroscópica, que naquelas feridas tratadas com óleo a cicatrização era mais tardia em relação ao grupo controle tratado com solução salina. Da mesma forma, na avaliação microscópica, os animais tratados com a planta medicinal apresentavam o tecido mais inflamado e com menos fibras colágenas. Por outro lado, PAIVA et al. (2002) investigaram a atividade de cicatrização de ferida em ratos através de estudo com *Copaifera langsdorffii* e obtiveram resultados que permitiram afirmar os efeitos benéficos do óleo-resina desta espécie, justificando o uso tradicional para o tratamento de feridas.

2.4 Inflamação

2.4.1 Introdução geral

A reação do organismo frente a agentes inflamatórios ou agentes flogogênicos vem sendo estudada desde os tempos antigos. Há mais de 2000 anos, Aulus Celsus (30 a. C – 38 d. C) já descrevia sinais clínicos causados por agentes agressores, conhecidos como os quatro sinais cardeais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Mais tarde, o médico grego Galeno (130 – 201 d. C) acrescentou aos sinais cardeais um quinto sinal, que seria a perda da função (FANTONE & WARD, 2002).

O que até então era conhecido como doença, pode ser visto como uma reação benéfica, através das explicações de John Hunter (1728 – 1793), que compreendeu a inflamação não como uma resposta deletéria, mas como um processo benéfico, ao demonstrar que o rubor e o calor eram conseqüência do maior aporte sanguíneo em virtude da dilação dos vasos. Contudo, como em outros processos orgânicos, a inflamação pode alcançar condições aberrantes e lesivas (RINGLER, 1997).

Com os avanços tecnológicos e com auxilio da microscopia, pesquisadores como Rudolf Virchow (1821 – 1905), Julius Cohnheim (1839 – 1884), Elie Metchnikoff (1845 – 1916) e Thomas Lewis (1881 – 1945) puderam descrever detalhes como: reações celulares, eventos vasculares, o papel da fagocitose e a influência de mediadores químicos (RINGLER, 1997; TIZARD, 1998; FANTONE & WARD, 2002; DIAS da SILVA & MOTA, 2003).

Historicamente a inflamação é classificada como aguda e crônica, de acordo com a duração, características histopatológicas, severidade e natureza da resposta inflamatória e, apesar de parecer fases isoladas, o processo inflamatório e a reparação de um tecido são fenômenos dinâmicos, constituídos de diversas etapas, sem limite muito bem definido, que se inter-relacionam no sentido de localizar, tentar eliminar o agente agressor e, por fim, ajudar a iniciar o reparo do dano tecidual (TIZARD, 1998).

2.4.2 O tecido conjuntivo é o substrato anatômico da resposta inflamatória

O processo inflamatório ocorre basicamente no tecido conjuntivo vascularizado, onde células sanguíneas, células do estroma e todas as estruturas dentro deste microambiente estão envolvidas (BUCKLEY et al. 2001). O tecido conjuntivo possui duas grandes populações de células. As células teciduais próprias ou residentes como os fibroblastos/fibrócitos, macrófagos/histiócitos e mastócitos e certas subpopulações de células dendríticas e as células migrantes ou em trânsito tais como os neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e eventualmente, linfócitos e certas subpopulações de células dendríticas (DIAS da SILVA & MOTA, 2003).

Em uma injúria tecidual não ocorre apenas a morte de células, mas também a matriz de sustentação da arquitetura celular é progressivamente destruída, resultando em colapso e distorção de estruturas normais. Muitos componentes da matriz são cruciais para a homeostase e funcionamento normal do tecido (DUFFIELD, 2003). Além do envolvimento das células do tecido conjuntivo e dos vasos sanguíneos, o processo inflamatório também envolve as fibras, em especial as colágenas, reticulares, fibronectinas e elásticas e a substância fundamental amorfa. Essa substância amorfa é constituída de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos podem ser: condroitin-sulfato, queratan-sulfato, dermatan-sulfato e heparan-sulfato. Esses glicosaminoglicanos encontam-se associados aos proteoglicanos, que se caracterizam por uma diversidade molecular e de localização como, por exemplo, nas membranas celulares, onde são encontradas moléculas de sindecam, ou nas membranas basais, as moléculas de perlecam (OKSALA et al. 1995).

Ou seja, todas as estruturas do tecido conjuntivo são particularmente importantes na iniciação da inflamação, por serem: (1) o alvo do irritante primário; (2) as estruturas mais afetadas pela lesão causada às células adjacentes; (3) por induzirem o exsudato inflamatório; (4) por produzirem os mediadores inflamatórios, entre eles incluem-se moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (DOUGLAS, 2000; DAVIS et. al., 2003).

2.4.3 As alterações vasculares

Alterações hemodinâmicas ocorrem quase imediatamente após uma lesão tecidual, através do envolvimento de diversos mediadores inflamatórios capazes de promover alterações vasculares que resultam em modificações no calibre dos vasos, no fluxo de sangue e também em alterações na permeabilidade capilar (DOUGLAS, 2000).

Essas alterações vasculares proporcionam o acontecimento de três fenômenos importantes no desenvolvimento da inflamação: a hiperemia ativa, a estase sanguínea e a exsudação. Nos momentos iniciais ocorre a constrição transitória das arteríolas locais, segundos depois, os pequenos vasos sanguíneos se dilatam e os capilares enchem-se de sangue, caracterizando assim a hiperemia ativa, representada clinicamente pela vermelhidão do local. Esses capilares permanecem abertos pela presença de glóbulos vermelhos e a circulação torna-se mais lenta, caracterizando a estase sanguínea. Além disso, há a saída de líquido de origem plasmática, rico em proteínas, denominado exsudato, de dentro dos vasos para os espaços extravasculares, causando a diminuição intravascular e aumento extravascular da pressão osmótica, o que resulta no aumento da pressão hidrostática e conseqüente formação do edema no tecido conjuntivo (RINGLER, 1997; DIAS da SILVA & MOTA, 2003).

2.4.4 Os mediadores inflamatórios

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente sinais locais. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos. Sob influência desses mediadores, os vasos sanguíneos expostos a injúrias endoteliais passam a apresentar mecanismos biologicamente ativos, que atuam no sentido de promover a regeneração e restabelecimento da homeostase, e também de favorecer o desenvolvimento da inflamação. Isso inclui a ativação plaquetária, migração e proliferação de células de músculo liso, deposição de

matriz extracelular e também o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ROSENBERG & GALLIN, 2003).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados quanto à função: aqueles com propriedades vasoativas e de contração de músculo liso como histamina, serotonina, Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e os metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos; as proteases do plasma que consistem de cininas, fatores da coagulação e moléculas ativadas do sistema complemento; citocinas liberadas por leucócitos e células teciduais e moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio (FORD-HUTCHINSON, 1990; MAJNO & PALADE, 1961; MALMSTEN, 1986; SIROIS & BORGEAT, 1984; HICKLEY & KUBES, 1997).

MAJNO & PALADE (1961) conseguiram constatar as atividades vasoativas das moléculas de histamina e serotonina, uma vez que elas eram capazes de tornar as junções intercelulares das células endoteliais praticamente desconectadas. O PAF é sintetizado por uma variedade de células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, fibroblastos e células endoteliais. Esse mediador inflamatório exerce atividades endócrinas, parácrinas e autócrinas, afetando uma variedade de tipos celulares. Entretanto, sua principal função no desenvolvimento da resposta inflamatória é provocar alterações de permeabilidade vascular (PRESCOTT et al., 2000).

O ácido araquidônico é um ácido graxo não saturado presente em fosfolipídios de membrana celular. Sua degradação gera uma reação enzimática complexa através de duas vias: uma delas é a via da cicloxigênase, que culmina na produção de prostaglandinas, e outra, a via da lipoxigenase, que culmina na síntese de leucotrienos. As prostaglandinas PGE_1 e PGE_2 induzem a inflamação e potencializam os efeitos de outros mediadores inflamatórios, principalmente da histamina e da prostaglandina Tromboxano A_2, que promove a agregação plaquetária e a vasoconstrição. Assim como as prostaglandinas, os leucotrienos também induzem a inflamação e potencializam os efeitos da histamina. Além disso, os leucotrienos possuem efeito na quimiotaxia e, portanto, no extravasamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos (SANDULACHE, 2007).

O sistema complemento é um sistema de cascata de proteínas que não só possui um importante papel no sistema de defesa, como também contribui para a amplificação da resposta inflamatória quando é ativado excessivamente ou de forma descontrolada, pois, a ativação do complemento, pode gerar anafilatoxinas como C3a, C4a e C5a, que promovem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Outro produto da ativação do complemento é o Complexo de Ataque à Membrana (MAC), um eficiente sistema de defesa contra microorganismos opsonisados. Além disso, esse sistema participa da ativação, adesão e quimiotaxia de leucócitos e aumenta a fagocitose (ABE, 2006).

Fagócitos (granulócitos e macrófagos) são equipados com enzimas que geram moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, altamente tóxicas e com potente atividade antimicrobiana, que quando são lançadas excessivamente no ambiente extracelular podem causar danos no tecido adjacente. O superóxido e peróxido de hidrogênio também servem como substrato para a enzima MPO, estocada nos grânulos primários dos neutrófilos. O óxido nítrico, além de propriedades vasodilatadoras, também regula outros mecanismos fisiológicos como a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos (NIU et al., 1994; HICKLEY & KUBES, 1997). As citocinas Fator de Necrose Tumoral - α (TNF-α) e Interleucina - 1 (IL-1), também exercem influência sobre a expressão de moléculas de adesão e participam de mecanismos regulatórios do extravasamento de leucócitos para o tecido (HICKLEY & KUBES, 1997).

2.4.5 Moléculas de adesão que participam do extravasamento de células

Quando o endotélio encontra-se ativado, está preparado para que ocorra o extravasamento de células, um fenômeno dependente da ligação entre moléculas de adesão dos leucócitos e a superfície endotelial, que resulta na transmigração de leucócitos do interior do vaso até o espaço extravascular. Este processo exige eventos de adesões transitórias, reguláveis, reversíveis, e inclui três passos: (1) marginação, rolagem e adesão no endotélio; (2) transmigração através das células endoteliais (diapedese); (3) migração nos tecidos em direção a estímulos quimiotáticos ou quimioatraentes (ALBELDA et. al. 1991).

Devido às mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sanguínea, mais precisamente devido à estase sanguínea, os leucócitos que circulavam no centro do vaso passam a circular mais próximo da periferia do fluxo e, daí, para a superfície do endotélio vascular. Esse fenômeno é conhecido como marginação leucocitária. Em seguida, os leucócitos aderem transitoriamente ao longo do endotélio (rolagem) e finalmente alguns pontos da superfície celular aderem mais firmemente (adesão). Na seqüência, os leucócitos inserem pseudópodes entre as junções das células endoteliais assumindo uma posição entre estas células e a membrana basal. Por fim, atravessam a membrana, passam para o espaço extravascular e migram em direção ao tecido intersticial afetado (TRAVIS, 1993; DIAS da SILVA & MOTA, 2003). As principais classes de moléculas de adesão celular envolvidas neste processo são as selectinas, integrinas e as moléculas de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas e glicoproteínas semelhantes à mucina e caderinas (DIAS da SILVA & MOTA, 2003).

Na classe das selectinas incluem-se: a P-selectina, que está estocada nos grânulos-α das plaquetas e nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e é mobilizada rapidamente para a superfície quando as células são estimuladas; a E-selectina, que não está sempre presente nas células endoteliais, porém são transcritas e mobilizadas para a superfície sob o estimulo de TNF-α, Interleucina 1β (IL-1β), toxinas bacterianas e oxidantes; e por último a L-selectina, que está presente em muitos leucócitos. As selectinas ligam-se aos oligossacarídeos que, por sua vez, estão associados às várias glicoproteínas semelhantes à mucina, como: a Molécula de Adesão Celular Dependente de Glicosilação - 1 (GlyCAM-1), que é ligante de L-selectina; a Glicoproteína da P-selectina -1 (PSGL-1) e a molécula de Sialil-Lewis X (SLe^x), que são os ligantes primários de P-selectina e estão presentes na parede de leucócitos. A ligação entre essas moléculas promove uma interação de baixa afinidade e resulta no processo de rolagem (LEY et. al. 1998; DAVIS et. al. 2003; STEEBER et. al. 1998; TAKAHASHI et. al. 2001).

No grupo das moléculas de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas incluem-se duas moléculas de adesão endoteliais: as moléculas de adesão intracelular-1 e 2 (ICAM-1 / ICAM-2) e moléculas de adesão às células vasculares-1 (VCAM-1). Ambas interagem com integrinas encontradas nos leucócitos. As integrinas são proteínas heterodiméricas compostas por subunidade α e β. A VLA-4 é a principal β1-integrina em leucócitos e está expressa em eosinófilos, monócitos, linfócitos e não está presente em neutrófilos. Esta integrina é um ligante importante de VCAM-1 em células endoteliais. Já as β2-integrinas, LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CR3 ou CD11b/CD18) são expressas em leucócitos e se ligam a ICAM-1. Sob o estímulo das citocinas TNF-α e IL-1β as integrinas VLA-4 e LFA-1 nos leucócitos se convertem a um estado de alta afinidade o que resulta uma adesão firme entre as moléculas do leucócito e do endotélio. A β2-integrina Mac-1, também é capaz de se ligar a outros componentes da parede vascular, incluindo proteínas da matriz extracelular, tais como a fibronectina, laminina e o colágeno, assim como, às proteínas da coagulação, fibrinogênio, fator X e proteínas desnaturadas (LEY et. al. 1998; DAVIS et. al. 2003; STEEBER et. al. 1998; TAKAHASHI et. al. 2001).

2.4.6 Migração leucocitária para o tecido lesado

O sistema imune funciona como um sistema vigilante contra a invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos teciduais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. Para isso existe a necessidade do recrutamento de leucócitos até o local da inflamação aguda ou crônica, envolvendo a interação dos leucócitos, especialmente neutrófilos e monócitos, com o endotélio vascular (BROWN, 1997).

A migração leucocitária inicia-se no processo de extravasamento e ocorre através da ligação instável entre a P-selectina, expressa na parede do endotélio, e as glicoproteínas SLe^x e PSGL-1, presentes na parede dos neutrófilos e monócitos. Como essa ligação não possui resistência ao fluxo sangüíneo, os leucócitos promovem uma rolagem ao longo da parede endotelial. Posteriormente, ainda sob estímulos de mediadores inflamatórios, as células endoteliais passam a expressar E-selectina, que também se liga às

glicoproteínas. Ao mesmo tempo, interações entre integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas começam a ser estabelecidas, principalmente entre as β2-integrinas e ICAM-1. As citocinas TNF-α e IL-1β produzidas por macrófagos teciduais entram nos vasos, ligam-se nas moléculas de sulfato de heparan das células endoteliais e a presença dessas citocinas também ativa os leucócitos que estão em rolamento e induz uma adesão mais firme com o endotélio durante a inflamação aguda (KAKKAR & LEFER, 2004; LEY et. al. 1998; STEEBER et. al. 1998).

Uma vez aderido ao endotélio os leucócitos iniciam o processo de transmigração até o espaço subendotelial através das junções intercelulares endoteliais. As β2-integrinas, LFA-1 e de Mac-1, são expressas tanto nos leucócitos como nas junções intercelulares e são moléculas importantes nesse processo, assim como, uma molécula de adesão, a PECAM-1, presente principalmente na superfície das plaquetas e células endoteliais, mas também na superfície de leucócitos. Essa molécula é homologa a uma glicoproteina presente em plaquetas e células endoteliais de bovinos, a molécula de adesão celular do endotélio (endoCAM). A PECAM-1 também é expressa em monócitos do sangue, neutrófilos, plaquetas e em algumas células T (ALBELDA et. al. 1991).

SOLOWIEJ et al. (2003), com a possibilidade de utilizar animais "*Knockout*" para PECAM-1, conseguiram compreender melhor o papel dessa molécula no processo inflamatório. Estes autores perceberam que a falta de PECAM-1 afeta tanto o processo de migração celular de leucócitos como também o desenvolvimento do mecanismo de reparação, como por exemplo, na deposição de matriz extracelular e angiogênese.

2.4.7 Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células encontradas em áreas de tecido lesado. Possuem tempo de vida curto e contêm no citoplasma enzimas e substâncias antibacterianas que são usadas para destruir e degradar as partículas endocitadas. Ao contrário de outras células envolvidas na resposta inflamatória, como os macrófagos, mastócitos e células dendríticas, os neutrófilos não habitam os tecidos antes de uma lesão ou infecção. Porém, devido à

produção de reativos de oxigênio e nitrogênio, são capazes de exacerbar e propagar a inflamação (MEDZHITOV, 2003).

A migração celular ocorre sob a influência de substâncias quimiotáticas, como os componentes do complemento (C5a), fatores de crescimento de polipeptídios (Fator de Crescimento de Nervo (NGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)), citocinas (Interleucina-8 (IL-8) e FNT-α) e mediadores lipídicos (leucotrienos B_4, PAF) (NOHGAWA et al., 1997). REIBMAN et al. (1991) também demonstram que o Fator de Crescimento Transformador-β1 (TGF-β1) tem importante participação na migração de neutrófilos na presença de IL-1 e FNT-α.

TAKAHASHI et al. (2001) estabeleceram três passos para que ocorra o recrutamento de neutrófilos. O primeiro passo ocorre via citocinas e mediadores inflamatórios, como IL-8 e PAF produzidos por células endoteliais ativadas. No segundo passo, os primeiros neutrófilos aderem ao endotélio via Mac-1 e ICAM-1 sob a influência de células endoteliais ativadas e PAF. O terceiro, e provavelmente o mais potente deles, é a síntese de Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos Macrófagos (GM-CSF) pelo endotélio ativado, sendo que este último passo aumenta a ativação dos neutrófilos durante a migração transendotelial e resulta em maior atividade efetora dessas células.

Embora TAKAHASHI et al. (2001) tenha atribuído à molécula GM-CSF a principal responsável pela ativação dos neutrófilos durante a transmigração, WU et al. (2005) utilizaram um ensaio *in vitro* e esclareceram que a molécula PECAM-1 é essencial na migração celular de neutrófilos quando eles são estimulados por IL-8, uma vez que perceberam que neutrófilos deficientes em PECAM-1 têm a migração direcionada e a velocidade de migração diminuídas. Além disso, esses autores sugeriram que esses fenômenos são regulados por moléculas intracelulares que participam da transdução de sinais, como por exemplo, as Proteínas tirosinas fosfatases SHP-1 e SHP-2.

2.4.8 Monócito

O monócito é um segundo tipo celular que se envolve no processo inflamatório após a injúria do tecido. Essa célula é precursora circulante dos macrófagos, possui baixa capacidade fagocítica e alta expressão de moléculas adesão. Durante a resposta inflamatória os monócitos migram em direção ao local da injúria onde já existe grande número de macrófagos residentes teciduais (BIANCO et al. 1979). A interação entre monócitos e células endoteliais pode induzir a síntese de GM-CSF o que estimula a produção desse tipo celular pela medula óssea, ocorrendo o conseqüente aumento da quantidade dessas células no espaço subendotelial (DUFFIELD, 2003; TAKAHASHI, et al., 1996).

Quando alcançam o espaço subendotelial, os monócitos ficam expostos a um ambiente de citocinas, quimioatraentes e fatores de crescimento, o que induz a diferenciação em macrófagos e sua conseqüente ativação. Os macrófagos aparecem nos cortes de tecido como células arredondadas, mais volumosas que os fibrócitos, de citoplasma claro e núcleo irregularmente pregueado. Essas células possuem receptores de membrana que reconhecem estruturas estranhas, presentes na superfície dos patógenos, diferentes daquelas encontradas nos tecidos do hospedeiro. JANEWAY (1989), citado por MEDZHITOV (2003), descreveu a existência de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs), esses padrões são motivos altamente conservados, essenciais para a vida e virulência dos patógenos, e são detectados por receptores do hospedeiro conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (*pattern-recognition receptors* - PRRs). Esse sistema de reconhecimento possibilita a resposta adequada para o patógeno identificado.

Além de PRRs que sinalizam a presença de infecção, os macrófagos também possuem PRRs fagocíticos. Esses receptores auxiliam no processo de fagocitose e servem para o reconhecimento de receptores de Fc de imunoglobulinas, componentes da parede celular de microorganismos, componentes alterados da matriz extracelular e debris ou restos celulares. Um importante exemplo de PRR fagocítico é o “Scavenger receptor”, uma glicoproteína de superfície celular presente nos macrófagos e com alta

capacidade de fazer o reconhecimento de partículas não opsonisadas, como componentes da matriz extracelular e debris celulares (PALECANDA & KOBZIK, 2001; MEDZHITOV, 2003).

Os macrófagos desempenham funções variadas, muitas das quais estão envolvidas no processo inflamatório. Conforme RINGLER (1997), a ativação dos macrófagos aumenta a capacidade de síntese de um grande repertório de produtos proinflamatórios, como IL-1, FNT-α, PAF, prostaglandinas, componentes do sistema complemento, produtos da procoagulação como os fatores V e VII da coagulação e a tromboplastina. Além disso, essas células são capazes de elaborar lisozimas, proteases, e lipases que não só tem a capacidade de matar microorganismos, mas também facilitam a digestão e subseqüente remoção do tecido lesionado ou morto.

De acordo com a revisão de DUFFIELD (2003), a ativação dos macrófagos pode ser induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, a ligação com receptores de citocinas (IFN-γ, FNT-α, IL-1, IL-12), a exposição aos produtos do complemento, fatores de coagulação e porções Fc de imunoglobulinas, além de exposição aos produtos bacterianos (lipopolissacarídeo (LPS), DNA bacteriano, carboidratos), hipóxia do tecido e também exposição à matriz extracelular anormal. Contudo, nem todas as citocinas causam a ativação dos macrófagos. As citocinas IL-4, TGF-β, IL-10 e IL-13 exercem um papel regulador antiinflamatório, o que não significa a inativação dos mesmos, uma vez que eles aumentam a capacidade fagocítica de restos celulares e partículas.

A fagocitose representa uma das mais importantes manifestações da reação inflamatória aguda. Entretanto, os metabólitos do oxigênio gerados nos processos de digestão celular são letais tanto para os agentes agressores quanto para as células adjacentes à lesão. Por esse motivo há a necessidade de controle do processo inflamatório para que ele não alcance condições aberrantes e lesivas (RINGLER, 1997). Entretanto, para DUFFIELD (2003), quando os macrófagos se envolvem na ingestão de células mortas no processo inflamatório, as atividades pró-inflamatórias desempenhadas por essas células diminuem e então os macrófagos se alteram para células com uma capacidade melhor de iniciar o processo de reparo e cicatrização do tecido.

2.4.9 Mastócitos

Os mastócitos são comumente distribuídos pelo corpo no tecido conjuntivo e são muito similares em suas propriedades aos basófilos. Particularmente, os mastócitos protegem a superfície das mucosas dos pulmões e do trato gastrointestinal, além da derme. Os mastócitos geram uma série de mediadores inflamatórios heterogêneos quanto à sua potência e função biológica, dentre eles os grânulos secretórios pré-formados, como a histamina e proteases, mediadores derivados de lipídeos como leucotrienos e prostaglandinas e, por fim, diferentes tipos de citocinas e quimiocinas (METCALFE et al., 1997; MOTA, 1995), tais como TNF-α e TGF-β (WALSH et al., 1991; RODELLA et al., 2006).

REZZANI, et al. (2004) e RODELLA et al. (2006) defendem a hipótese de que os mastócitos estão diretamente envolvidos na resposta inflamatória para corpo estranho e que a produção de mediadores derivados de mastócitos têm grande importância no desenvolvimento de mecanismos patológicos da inflamação e reparo.

2.4.10 Plaquetas

Além das suas funções em processos hemostáticos e formação de trombos após a injúria do endotélio, as plaquetas do sangue também participam, pelo menos em parte, dos processos inflamatórios e de reparo do tecido. Para esse propósito as plaquetas colaboram com todos os tipos de leucócitos. As plaquetas ativadas secretam substâncias quimiotáticas, auxiliam as ligações entre os leucócitos e o endotélio, facilitando o extravasamento, e ainda podem influenciar a resposta inflamatória, estimulando ou inibindo vias. Porém, as próprias plaquetas contêm uma série de substâncias pró-inflamatórias, e conseqüentemente são consideradas células efetoras e mediadoras da inflamação (KLINGER,1997).

2.5 Reparo e cicatrização do tecido

Para muitos, o processo de cicatrização é considerado uma evolução do processo inflamatório crônico, mas para outros, concomitante com o processo inflamatório estão ocorrendo simultaneamente processos de reparação na tentativa de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, ou seja, há um desencadeamento do processo de cicatrização desde o inicio dos processos inflamatórios instalados no tecido (ANDRADE, 1999). O mecanismo de cicatrização de uma lesão total da pele é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos, que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular de todas as camadas, incluindo a epiderme, derme, hipoderme e panículo carnoso (MANDELBAUM et al, 2003).

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização. Entretanto, a maioria dos autores considera basicamente três estágios no processo de reparação: inicialmente um estágio inflamatório, seguido de uma fase fibroblástica, na qual ocorrem as fases de contração, proliferação e reepitelização e, por fim, o reparo acaba em um estágio de maturação e remodelação (MARTINEZ-HERNANDEZ, 2002).

2.5.1 Fase inflamatória

Uma injúria tecidual quase sempre provoca uma lesão de vasos sanguíneos, ativando a cascatas de coagulação, do complemento e das cininas, provocando a ativação do plasminogênio, a agregação e ativação de plaquetas. Assim, a primeira fase do processo de cicatrização se inicia com fenômenos coagulativos (BALBINO et al, 2005).

Essa seqüência inicial de eventos proporciona os estímulos necessários para que ocorra a fase inflamatória, caracterizada por uma reação inflamatória aguda no local. Como falado anteriormente, os neutrófilos são as primeiras células atraídas para o local, com a função de matar e fagocitar microorganismos que estiverem presentes. Entre dois e cinco dias após a injúria, os macrófagos migram para a lesão com o intuito de auxiliar os neutrófilos na

fagocitose de microorganismos e de células apoptóticas, mas acima de tudo, para promover a limpeza de debris teciduais e produzir citocinas e fatores de crescimento. Por último, os linfócitos chegam na área da lesão e também secretam várias citocinas e fatores de crescimento (STEENFOS, 1994; MANDELBAUM et al, 2003).

Os fatores de crescimento podem ser definidos como peptídeos sinalizadores que atuam através de receptores de superfícies celulares específicos. Formam um sistema de comunicação entre as células e também entre as células e a matriz extracelular. Eles afetam a síntese e degradação da matriz extracelular, além da proliferação e recrutamento de células para o local da ferida. Mais de 30 fatores de crescimento já foram reconhecidos, mas nem todos têm importância significativa no processo de cicatrização. Dentre os fatores de crescimento com maior importância estão: Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), PDGF e TGF-β (STEENFOS, 1994; KWON et al, 2006). Coletivamente os fatores de crescimento são responsáveis pela próxima seqüência de alterações que caracterizam a fase fibroblástica (ADZICK & LORENZ, 1994).

O Quadro 1 traz um resumo dos principais fatores de crescimento e de seus efeitos no desenvolvimento dos mecanismos envolvidos no reparo dos tecidos.

QUADRO 1 – Fatores de crescimento envolvidos no reparo dos tecidos.

Fator	***Origem***	***Efeitos nos processos de reparo***	***Referência***
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	Plaquetas, macrófagos e células endoteliais.	1. Quimiotáxico para fibroblastos, monócitos, polimorfonucleares, células de músculo liso. 2. Induz a produção de superóxidos por neutrófilos e a síntese de colagenase por fibroblastos. 3. Mitogênico para fibroblasto e induz a modificação em miofibroblasto. 4. Aumenta a produção da matriz extracelular pelo fibroblasto.	DEUEL & HUANG, 1984. ROSS et al, 1986.
Fator transformador do crescimento β (TGF-β)	Plaquetas, linfócitos T, macrófagos.	1. Quimiotáxico para fibroblastos e leucócitos. 2. Regulação da proliferação celular (inibe a reepitelização e estimula a proliferação de fibroblastos). 3. Estimula a produção da matriz extracelular. 4. Induz a diferenciação em miofibroblasto e a expressão de α-actina de músculo liso. 5. Induz a produção de outros fatores.	GABBIANI, 2003. VAUGHAN et al., 2000.
Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGF)	Diferentes tipos celulares.	1. Estimula a angiogênese (quimiotáxica e mitogênica). 2. Mitogênico para o endotélio, músculo liso, fibroblastos e queratinócito. 3. Estimula a reepitelização. 4. Afetam a diferenciação de muitos tipos celulares.	WERNER & GROSE; 2003.
Fator de Crescimento epidérmico (EGF)	Plaquetas e Macrófagos Células de músculo liso.	1. Aumenta a proliferação do epitélio, endotélio e fibroblastos. 2. Aumenta a proliferação de glicosaminoglicanos. 3. Diminui a síntese de colágeno. 4. Aumenta a força tensil de ferida incisional.	STEENFOS, 1993. WERNER & GROSE; 2003.
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Macrófagos, queratinócitos e células endoteliais.	1. Estimulador da angiogênese. 2. Aumento da permeabilidade vascular.	FUJII et al., 1997 BRKOVIC & SIROIS, 2007 LEUNG, et al., 1989
Fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF)	Células endoteliais	1. Estimula a proliferação e quimiotaxia de fibroblasto. 2. Induz a produção de matriz extracelular, colágeno e fibronectina. 3. Promove angiogênese.	IGARASHI et al., 1993. WERNER & GROSE; 2003.
Fator de crescimento de nervos (NGF)	Células epiteliais, fibroblastos	1. Crescimento de nervo. 2. Quimiotáxico para neutrófilos. 3. Proliferação de queratinócito. 4. Aumento da expressão de moléculas de adesão no vaso do tecido de granulação.	NOHGAWA et al., 1997; WERNER & GROSE; 2003.

2.5.2 Fase fibroblástica ou proliferativa

Na segunda fase da cicatrização os fibroblastos, através da ação do TGF-β, adquirem morfologia e características bioquímicas de células de músculo liso, incluindo a expressão de Actina de Músculo Liso - α (ASMA-α), e são conhecidos então como miofibroblastos (GABBIANI, 2003). Os fibroblastos se proliferam logo após a agressão e se tornam células ativadas que formam um arcabouço contrátil aproximando as bordas da ferida. Também sintetizam colágeno, elastina, fibronectina, proteoases e glicosaminoglicanas, formando o tecido de granulação, que representa o novo tecido que cresce para preencher o tecido perdido (MANDELBAUM et al, 2003). Ou seja, o tecido de granulação compreende uma matriz frouxa de colágeno, rica em fibronectina, que atua como substrato para a fixação celular, e em ácido hialurônico, um glicosaminoglicano importante por enfraquecer a fixação das células (ADZICK & LORENZ, 1994). A combinação desses dois fatores cria um ambiente eficiente para a movimentação celular. A fibronectina e o ácido hialurônico são os componentes predominantes da matriz durante as primeiras fases do reparo de uma ferida. À medida que a ferida vai se curando diminui a concentração de ácido hialurônico e aumenta a concentração de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos tais como o heparan-sulfato, o dermatan-sulfato e o condroidin-sulfato. Essa alteração da composição de proteoglicanos cessa a movimentação das células (OKSALA, et al, 1995; RINGLER, 1997).

O tecido de granulação não é rico apenas em fibroblastos e em elementos da matriz extracelular, mas também contêm outros tipos celulares e novos vasos sanguíneos. O fenômeno da angiogênese é influenciado pela ação de diversos fatores produzidos por macrófagos, mastócitos, plaquetas e fibroblastos, e é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MANDELBAUM et al, 2003). As células endoteliais de capilares intactos das regiões adjacentes às lesões migram para o espaço ocupado pela ferida, diferenciam-se formando novos tubos capilares. Em geral, a proliferação das células endoteliais ocorre apenas no vaso-genitor para a devida substituição das células que migraram. Outro fenômeno presente na fase proliferativa é a reepitelização, que ocorre sob influência principalmente do EGF e se inicia

poucas horas após ter ocorrido a lesão. As células epiteliais das margens da ferida sofrem hiperplasia, mitoses e migram lateralmente da membrana basal subjacente, promovendo então o crescimento de tecido epitelial e restabelecendo a continuidade total do tecido (MARTINEZ-HERNANDEZ, 2002; MANDELBAUM et al, 2003).

2.5.3 Fase de remodelação

A remodelação é a última das fases da cicatrização. Ocorre no colágeno e na matriz, inicia-se por volta do décimo dia após a lesão e prolonga-se por meses. Essa fase é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações da matriz extracelular pela ação da enzima metaloproteinase, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. Nesta fase a neovascularização diminui e tardiamente a cicatriz é considerada avascular (STEENFOS, 1994; DESMOULIÈRE et al., 2005).

2.5.4. Reparo ou regeneração do panículo carnoso

O processo de reparo e regeneração do músculo pode ser dividido em quatro fases interdependentes: a degeneração, inflamação, regeneração e fibrose. Esse processo de recuperação do músculo envolve não apenas as células musculares danificadas, mas também desperta diversos mecanismos inflamatórios e envolve tecidos adjacentes, como as fibras musculares saudáveis, o tecido conjuntivo e os vasos sanguíneos. A injúria induz rapidamente a necrose das miofibras e a ativação da inflamação, o que resulta na migração de células inflamatórias para fazer a limpeza do material necrótico e também sintetizar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (PELOSI et al., 2007).

O principal fator de crescimento envolvido no processo de regeneração muscular é o Fator de Crescimento como a Insulina-1 (IGF-1), que acelera a regeneração e limita a fibrose, pois regula a expressão de citocinas inflamatórias como o TNF-α, a IL-1β e as citocinas CC (Proteína Inflamatória do Macrófago -

1α (MIP-1α) e Proteína Quimioatraente de Monócitos – 1 (MCP-1)) importantes quimioatraentes de monócitos e macrófagos (PELOSI et al., 2007; WARREN et al., 2004).

Quando um insulto é extenso e o infiltrado inflamatório é persistente a regeneração não é possível e o reparo ocorre principalmente por fibrose. Entretanto, quando o sarcolema (tubo sarcolemal) permanece intacto e os segmentos necróticos são pequenos, a regeneração é rápida e efetiva, tornando-se quase indistinguível do segmento normal (McGAVIN, 1998).

Embora as células musculares esqueléticas não tenham atividade mitótica, o músculo estriado esquelético possui uma capacidade de regeneração considerável pela ação de células satélites. Essas células são pequenas, mononucleares, quase sempre estão em associação com a célula do músculo esquelético, entre a lâmina basal e o plasmalema, e parecem ter a função de mioblastos reservas (ADAMS, 2006). Elas estão em estado quiescente e quando estimuladas são ativadas pelas vias de ativação gênica MyoD e Myf5, o que resulta na sua proliferação. Depois de proliferar, algumas fazem a migração para o centro da fibra e fundem-se para formar novos miotubos e outras retornam ao estado de quiescência para formar uma população reserva (COOPER et al., 1999). Os miotubos recém formados no processo de regeneração são células musculares finas, alongadas, com uma fileira central de núcleos próximos uns aos outros, basofílicas e sem estriações (McGAVIN, 1998).

Quando o insulto ao músculo ultrapassa a extensão de dois a quatro milímetros sem perder grande quantidade de células satélites, mas é suficiente para romper o tubo sarcolemal da miofibra, como ocorrem em lesões de rupturas, injeções de substâncias irritantes e incisões cirúrgicas, a regeneração da miofibras é por brotamento. Esse tipo de regeneração compreende com a formação de células gigantes musculares, que são produtos da fusão de mioblastos, formando células multinucleadas. A presença de células musculares gigantes indica que as condições para a regeneração não são ótimas e que a reparação será completada com fibrose (McGAVIN, 1998, VAN VLEET, 2000).

2.6 Fatores que influenciam no processo de reparação tecidual

De acordo com CARRICO et al. (1984), alguns fatores podem exercer influência significativa na fisiologia normal do processo de reparação tecidual, como por exemplo, o estado nutricional, o estado imunológico, a oxigenação do tecido e o volume de sangue circulante. MANDELBAUM et al., (2003) acrescentaram a esses fatores a idade, a presença enfermidades, a localização da ferida, a técnica cirúrgica, o uso de medicamentos tópicos ou sistêmicos, a contaminação da ferida e também a presença de corpos estranhos.

A presença de um corpo estranho no tecido rompe a seqüência de eventos nos quais as células e seus produtos interagem no sentido de reparar o tecido lesado, o que resulta em uma alteração visível da morfologia do tecido. Isso se deve ao fato de muitos tipos celulares, principalmente os macrófagos, deixarem de se envolver na cicatrização normal e passarem a exercer uma outra função: a interação célula/corpo estranho, já que a capacidade de reconhecer superfícies estranhas também é uma propriedade importante dos macrófagos RODELLA et al., (2006).

Quando um irritante em particular não pode ser removido pelas reações inflamatórias agudas e crônicas típicas, o hospedeiro desenvolve um tipo de resposta inflamatória na tentativa de seqüestrar, fagocitar, e destruir o agente incitante, um tipo de resposta que envolve principalmente células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas. Essa resposta é conhecida como resposta inflamatória granulomatosa (SAUNDERS & COOPER, 2000). Nesse sentido estão os irritantes, que são pouco solúveis, persistentes e não facilmente degradáveis pelos macrófagos, como por exemplo, diversos agentes não infecciosos ou inertes como, talco, sílica, belúrio, zinco, plástico, fibra, silicone, vidro e muitos outros (RINGLER, 1997; MARIANO, 1995). Contudo, não são apenas materiais inertes que são capazes de desenvolver esse tipo de inflamação. Diversos patógenos como bactérias, vírus, fungos, protozoários, vermes e também certos componentes desses patógenos, podem causar esse tipo de resposta, o que pode ser evidenciado pelos resultados de APOSTOLOU et al. (1999), que após a administrar a parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* na região subcutânea

da cauda de camundongos, verificaram após sete dias uma lesão do tipo granulomatosa com centro rico em neutrófilos, cercado por um envoltório que consistia de uma camada densa de macrófagos, linfócitos e fibroblastos.

2.7 Uma reação inflamatória para corpo estranho

O implante de biomateriais ou corpos estanhos como marca-passo, cateter, próteses, silicone, implantes dentários e muitos outros, está se tornando uma prática constante na medicina. Esses implantes despertam uma resposta inflamatória aguda e crônica que muitas vezes resulta em efeitos colaterais como fibroses e neovascularização ao redor do implante, coagulação e trombose, além de infecções e também desgastes no implante por ação de leucócitos (SOLOWIEJ, 2003). Na tentativa de entender melhor a resposta inflamatória para um corpo estranho implantado, TANG et al. (1998) dividiram arbitrariamente o processo em três fases: transmigração dos leucócitos pelas barreiras endoteliais, quimiotaxia até o implante e, por fim, a aderência de fagócitos na superfície do implante. Os primeiros resultados encontrados por esse grupo de pesquisa mostraram que a aderência entre a integrina Mac-1 do fagócito e o fibrinogênio que se acumula naturalmente na superfície são essenciais para a fixação das células no implante e que as moléculas de MIP-1α e MCP-1 também são potentes quimiocinas envolvidas no processo.

Como ainda não está muito bem elucidado o porque das células inflamatórias serem estimuladas a migrar em direção ao corpo estranho, TANG et al. (1998) levantaram a hipótese de que os mastócitos, juntamente com seus elementos granulares, possuem um papel chave nesse mecanismo, pois: (1) após o implante pode ser observado hiperemia e edema, o que é uma resposta típica mediada por histamina; (2) os mastócitos são reconhecidamente produtores de histamina; (3) a histamina estimula a transmigração de leucócitos pelo endotélio e também auto-regula a expressão de moléculas de adesão celular. De fato, após TANG et al. (1998) aplicarem bloqueadores de histamina em camundongos, o acúmulo de fagócitos no implante foi quase totalmente impedido. Da mesma forma, quando utilizaram camundongos deficientes em mastócitos, o número de

neutrófilos e macrófagos que migraram para o implante também foi significativamente menor.

RODELLA et al. (2006) avaliaram a cicatrização após a implantação de um corpo estranho (um molde de fibra de vidro) no espaço subcutâneo do dorso de ratos e constataram o aumento no número de mastócitos e de degranulação dessas células próximo ao implante. Para esses autores os mastócitos exercem um efeito bidirecional na cicatrização: diretamente, pela habilidade de produzir glicoproteínas da matriz extracelular; indiretamente, induzindo a síntese de certos mediadores pelos grânulos secretórios, como o TGF-β, que possui efeito fibrinogênico, aumentando a produção de colágeno e a expressão da enzima Metaloproteinase-2 (MMP-2), responsável pelo controle do depósito de colágeno na formação do tecido de granulação da ferida.

Para TANG et al. (1998), possivelmente o mecanismo de recrutamento de fagócitos para biomateriais pode ser resumido como segue: logo após a implantação, os biomateriais de alguma maneira provocam a ativação de mastócitos, que começam a lançar seus grânulos, incluindo a histamina. A histamina, então livre, promove hiperemia e aumento da expressão da molécula de adesão celular P-selectina. A auto-regulação das moléculas de adesão celular endoteliais aumenta o rolamento e a diapedese de células fagocíticas pela barreira endotelial. Uma vez na área geral do implante, as células fagocíticas migrantes são direcionadas até a superfície do implante por influência das quimiocinas MIP-1α e MCP-1. Finalmente, HU et al. (2001), concluíram que a aderência dessas células na superfície do implante ocorre, pelo menos em parte, por interação entre o Mac-1 do fagócito e fibrinogênio que espontaneamente aderiu na superfície do material, sofreu alterações conformacionais e expôs os motivos de fixação para as células. Após essa interação uma série de respostas inflamatória e cicatrizante se inicia.

Para SOLOWIEJ et al. (2003), a molécula PECAM-1 está diretamente envolvida no desenvolvimento das respostas inflamatórias e cicatrizantes. Usando animais normais e deficientes em PECAM-1, esses autores puderam observar que a falta dessa molécula induz a baixa atividade da enzima mieloperoxidase, caracterizando uma quantidade diminuída de neutrófilos no corpo estranho. Eles também perceberam menor acúmulo de monócitos/macrófagos no corpo estranho

implantado, a diminuição da neovascularização e da deposição de matriz extracelular ao redor do implante. FERREIRA et al. (2004), avaliaram a participação do PAF utilizando o mesmo modelo para avaliação da reação inflamatória para corpo estranho. Esses autores perceberam que a falta de receptor de PAF induz a diminuição do acúmulo de leucócitos, entretanto, causa o aumento da angiogênese.

Uma característica importante da resposta inflamatória para corpo estranho é a formação de células gigantes multinucleadas. Como citado anteriormente, as citocinas IL-4 e IL-13 exercem a função reguladora da resposta imune, mas também são essenciais na formação de células gigantes, induzindo a adesão de macrófagos para a formação de células multinucleadas (DeFIFE et al., 1997). Essa adesão de macrófagos é dependente de uma atividade cooperativa das integrinas β1 e β2 e utiliza vias de sinalização intracelulares tais como tirosina kinase e fosfatidilinusitol-3-kinase, como comprovado por McNALLY & ANDERSON (2002). A fisiopatologia da formação das células gigantes multinucleadas ainda não está muito bem explicada, porém sabe-se que representa uma associação de forças de células fagocíticas contra um material não fagocitável no desenvolvimento de uma inflamação crônica (McNALLY & ANDERSON, 2002).

BIRMAN & MARIANO et al. (1985) descreveram detalhadamente como ocorre o processo de migração celular para uma lamínula implantada no espaço subcutâneo frente a diferentes agentes inflamatórios. Para isto determinaram a influência de diferentes agentes inflamatórios na formação de células gigantes multinucleadas, quanto a sua morfologia e número de núcleos. Neste estudo também foram relatadas as características histológicas da cápsula que envolvia o corpo estranho. Além disso, os resultados encontrados por BIRMAN & MARIANO et al. (1985) mostraram que a formação de células gigantes no modelo de implante de lamínulas não é dependente das características do corpo estranho e sim da natureza da lesão inflamatória, particularmente das citocinas celulares no tecido inflamado que envolve o implante.

KYRIAKIDES et al. (2004), confirmaram em seus experimentos a participação da citocina CC2 (MCP-1) no processo de reação de corpo estranho. Esses autores avaliaram a resposta inflamatória após a implantação de corpo estranho em camundongos deficientes em Ligante de Quimiocina CC-2 (CCL2), como dito anteriormente, um quimioatraente de monócitos. Eles perceberam que a falta dessa quimiocina diminui a fusão de macrófagos e o número de núcleos em cada célula gigante quando comparado aos animais normais. Porém, a falta de CCL2 não interfere no encapsulamento do corpo estranho, conseqüentemente, o encapsulamento é uma característica influenciada principalmente por fatores ligados às características do material implantado e independente da formação de células gigantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antiinflamatória e cicatrizante do óleo de *Copaifera langsdorffii* através do estudo do perfil de migração celular para um corpo estranho implantado no tecido subcutâneo e por meio do exame histopatológico de pele de camundongos da linhagem BALB/c.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar macro e microscopicamente a ferida cirúrgica tratada ou não com o óleo de *Copaifera langsdorffii*.

Verificar a capacidade cicatrizante do óleo de *Copaifera langsdorffii* em lesões cirúrgicas e na presença de corpo estranho.

Caracterizar o perfil de migração celular para corpo estranho (lamínula de vidro) em camundongos BALB/c.

Verificar o perfil de migração celular para a lamínula de vidro implantada no tecido subcutâneo após o tratamento com *Copaifera langsdorffii.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha e obtenção da planta medicinal

A *Copaifera langsdorffii* foi escolhida por ser amplamente usada pela população em tratamentos tópicos que visam efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes.

O óleo da planta foi adquirido no Laboratório de Bioatividade de Plantas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, depois de ter sido devidamente identificado e submetido a testes biológicos.

4.2 Seleção e aclimatização dos animais

Os animais foram fornecidos pelo biotério de criação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, nulíparas e não gestantes, saudáveis e com idade entre 2 e 3 meses. Os animais foram alojados em caixas plásticas apropriadas, forradas com maravalha, receberam água e ração balanceada e apropriada para espécie, de forma *ad libitum.* Foram mantidos em condições ambientais apropriadas, evitando situações de estresse e risco sanitário. Antes de serem utilizados no estudo, os animais foram pesados e examinados, para que apenas aqueles que demonstravam estar clinicamente saudáveis e dentro da faixa de peso de 20 a 30 g fossem utilizados.

4.3 Padronização dos grupos de tratamentos

O protocolo de tratamento tópico foi definido após estudo piloto realizado em Outubro de 2005. Os grupos de tratamentos se dividiram em: grupo controle (C), que recebeu tratamento tópico com solução salina; grupo tratado com óleo mineral estéril (CV); outro tratado com óleo de *C. langsdorffii* e óleo mineral estéril na diluição de 1:1 (T1) e o último grupo com óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). O tratamento tópico foi realizado diariamente, sempre no período da manhã, durante todo o tempo experimental.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Foram utilizados 120 animais, sendo 30 controle e 90 tratados. No dia zero os animais foram divididos em quatro diferentes tratamentos, como exposto anteriormente. Para cada um dos tratamentos foram estabelecidos cinco diferentes pontos experimentais, sendo que esses pontos equivaliam ao dia correspondente da retirada da lamínula. A distribuição dos animais no experimento é apresentada no Quadro 2.

QUADRO 2 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos de tratamentos em cada um dos pontos experimentais correspondentes aos dias de extrações das lamínulas

	Dia da implantação cirúrgica da lamínula	Pontos experimentais (dia de retirada e análise das lamínulas)				
	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 14
Nº de animais	30 animais controle tratados com solução salina **(C)**	6	6	6	6	6
	30 animais tratados com óleo mineral estéril **(CV)**	6	6	6	6	6
	30 animais tratados com óleo de *C. langsdorffii* e óleo mineral estéril (1:1) **(T1)**	6	6	6	6	6
	30 animais tratados com *C. langsdorffi* puro **(T2)**	6	6	6	6	6

4.5 Contenção e anestesia dos animais

Os animais foram contidos de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e anestesiados com Cloridrato de 2-5,6-dihidro-4H-1,3-Tiazina e Cloridrato de cetamina (FLECKNELL, 1987), nas concentrações anestésicas recomendadas pelos laboratórios fabricantes. Após a anestesia foi realizada a tricotomia em uma área de aproximadamente 2 cm^2 e a limpeza da pele com álcool 70%.

4.6 Implante das lamínulas

Após a incisão transversal de 1 cm no plano dorsal da região torácica e divulsionamento da pele, cada animal recebeu por via subcutânea uma lamínula circular (12 mm de diametro). Momentos antes de ser implantada no tecido conjuntivo subcutâneo a lamínula esterilizada foi lavada com álcool 70%. Após o implante, a incisão cirúrgica foi suturada com fio de *nylon* e recebeu tratamento de acordo com o protocolo estabelecido. Para os animais controle, a incisão cirúrgica após ter sido suturada com fio de *nylon* foi tratada apenas com solução salina estéril, seguindo o mesmo protocolo.

4.7 Extração das lamínulas e coleta do material para histopatológico

As extrações das lamínulas e a coleta da pele para o exame histopatológico foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 (pontos experimentais). Para isso, os animais foram anestesiados com éter e tão logo sofreram deslocamento cervical, conforme normas do National Reseach Council (NRC). Primeiramente, foi realizado um corte paralelo à incisão cirúrgica para extração da lamínula do espaço subcutâneo e, posteriormente, um fragmento de pele dorsal contendo uma porção saudável e outra envolvendo toda a extensão da ferida foi coletado e fixado em formol tamponado a 10% (LUNA, 1968) para subseqüente avaliação histopatológica.

4.8 Montagem da lâmina do estudo de migração celular

Após serem extraídas do espaço subcutâneo as lamínulas foram lavadas com solução fisiológica, fixadas em metanol e coradas com a técnica de coloração rápida Instant Prov (Newprov®). Posteriormente, foram montadas em lâminas histológicas e levadas para leitura em microscopia de luz.

4.9 Contagem das células no estudo de migração celular

A contagem das células foi feita em microscópio de luz na objetiva de 100x. Cada lamínula foi dividida em 4 campos onde foram contadas duas vezes 100 células por campo e estabelecida uma média. Em cada lamínula foram somadas as médias das quantidades de neutrófilos, macrófagos e células gigantes dos quatro campos, sendo calculado então a média e o desvio padrão para cada tipo celular. Outros tipos celulares como linfócitos, mastócitos, eosinófilos e fibroblastos, foram apenas relatados e não fizeram parte da contagem.

4.10 Preparação das lâminas histológicas de pele

Os fragmentos de pele foram processados no Laboratório de Histopatologia da Escola de Veterinária da UFG, onde depois de fixados por 24 horas, receberam um corte transversal à incisão cirúrgica. Os fragmentos foram desidratados em soluções alcoólicas de concentração crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de baixo ponto de fusão. Os blocos foram cortados no Laboratório de Patologia do IPTSP em cortes histológicos de 5 μm de espessura, com auxílio de um micrótomo. Por fim, os cortes histológicos foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE).

4.11 Avaliação macro e microscópica da pele

A avaliação do processo de reparação foi realizada através da macroscopia e microscopia da pele de metade dos animais do estudo. Para isso foram selecionados aleatoriamente três animais de cada um dos tratamentos em cada ponto experimental. Foram analisados os aspectos relacionados à cicatrização como o estado geral da ferida (Ótimo, Bom, Regular), o aspecto da ferida (aberta, fechada) e observações relacionadas com a inflamação da ferida, como a presença de edema (0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso) e hiperemia (0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso).

A avaliação microscópica foi realizada em microscopia de luz no ponto exato de encontro das duas bordas da ferida. Foram avaliadas as três porções da pele, epiderme, derme e hipoderme, e também a camada muscular que forma o panículo carnoso. As três fases do processo de reparo (inflamatória, proliferativa e remodelação) foram avaliadas. As variáveis avaliadas foram: presença de crosta serocelular, necrose, infiltrado inflamatório, hemorragia, hiperemia, proliferação vascular, reepitelização da epiderme, hiperplasia da epiderme, proliferação fibroblástica, e presença de sinais de regeneração muscular. As avaliações foram representadas de forma semi-quantitativa: (0) ausente, (1) discreto, (2) moderado e (3) intenso. Alguns parâmetros foram representados apenas como presente ou ausente.

4.12 Análise estatística

Para a análise estatística da avaliação da atividade antinflamatória foram calculadas a média e o desvio padrão de cada tipo celular em cada ponto experimental, para cada um dos tratamentos. Posteriormente, como se tratava de uma distribuição normal, foi aplicada análise de variância paramétrica (ANOVA), para as médias de cada ponto experimental e Teste de “t” para avaliar as diferenças nas cinéticas das migrações celulares. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Para a avaliação dos resultados da macro e microscopia da pele foi calculada a mediana entre os grupos para cada um dos parâmetros avaliados.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do processo de reparo do 1º ao 14º dia.

O acompanhamento clínico dos animais foi realizado diariamente e não se observaram alterações comportamentais ou clinicas. No dia um, o aspecto macroscópico das lesões, como por exemplo, a presença de crostas, edema e hiperemia, era similar em todos os animais. Na microscopia, foi possível perceber que em todos os grupos as feridas cirúrgicas estavam cobertas por crostas formadas por debris celulares e fibrina, caracterizando um material amorfo classificado de acordo com MULLER & KIRK'S (1995) como crosta serocelular, apresentada na Figura 2. No grupo CV, a presença de crosta serocelular sobre a epiderme era menor do que nos demais grupos. Também constatou-se maior intensidade de necrose na epiderme dos animais do grupo T2, porém os demais grupos possuíam necrose discreta tanto na epiderme quanto no panículo carnoso, como exposto na Figura 3.

O primeiro dia corresponde ao início da fase inflamatória e pôde ser observado na macroscopia a presença de edema e hiperemia na pele de todos os animais. Na microscopia as alterações inflamatórias também estavam presentes, sendo descritas na Figura 4. Porém, essas alterações eram mais evidentes nos grupos C e T2. Esses dois grupos, em relação aos outros grupos tratados, apresentaram maior intensidade de hemorragia e hiperemia na derme. O infiltrado inflamatório na derme e panículo carnoso era predominantemente polimorfonuclear em todos os grupos. E apenas no grupo T2 observou-se maior intensidade de polimorfonucleares na derme. As observações microscópicas encontradas um dia após os tratamentos são apresentadas na Tabela 1.

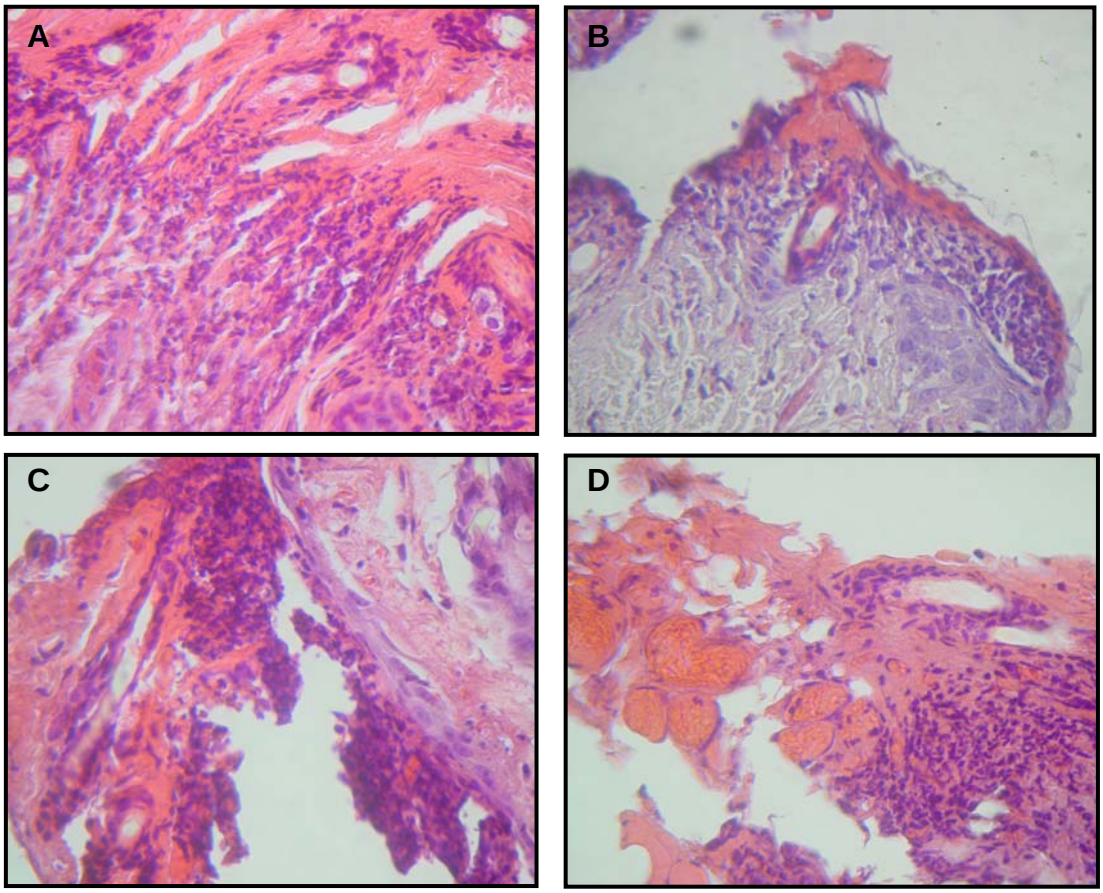

FIGURA 2 – Fotomicrografias da pele de camundongos um dia após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Nota-se a presença de crosta serocelular, formada de debris celulares e fibrina, em todos os grupos, porém em menor quantidade no grupo CV (B). As imagens correspondem a um campo representativo de um animal por grupo. HE. Aumento: 40x.

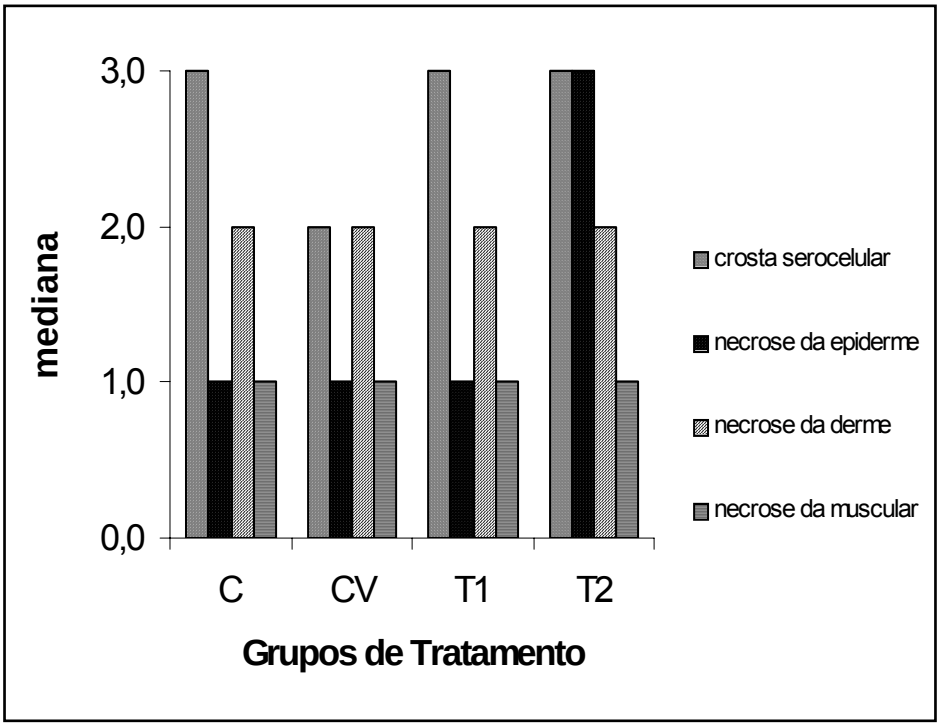

FIGURA 3 – Intensidade da necrose e crosta serocelular um dia após a incisão cirúrgica. O gráfico apresenta as intensidades da necrose e da presença de crostas encontradas no histopatológico da pele do dorso de camundongos da linhagem BALB/c que foram tratados topicamente com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2) um dia após ter sido feita uma incisão cirúrgica de 1 cm para o implante de um corpo estranho no espaço subcutâneo. Os valores do gráfico correspondem a mediana entre o grupos (n=3) para cada um dos tratamentos.

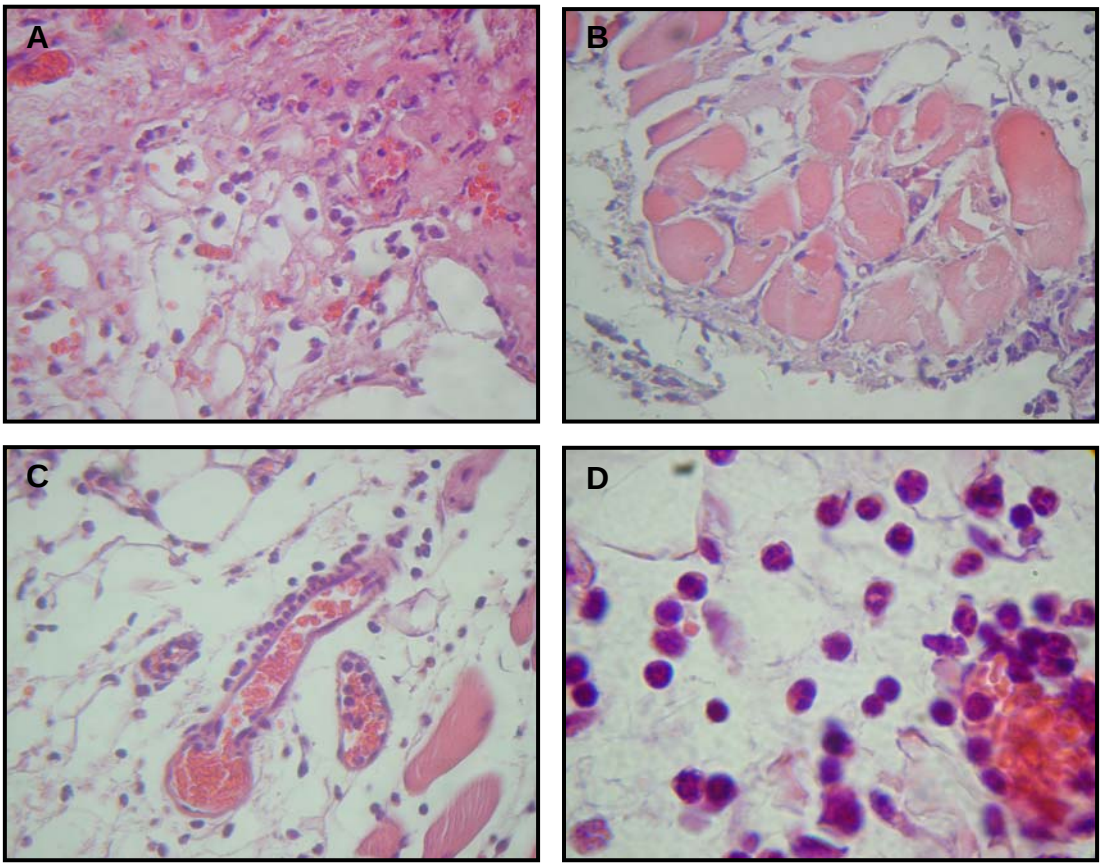

FIGURA 4 – Fotomicrografias da fase inflamatória do processo de reparo da pele de camundongos um dia após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril. Nota-se a presença de hemorragia, hiperemia moderada na derme, acompanhada de discreto infiltrado inflamatório de polimorfonucleares. (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril. Nota-se área de necrose coagulativa no panículo carnoso, acompanhada de células inflamatórias. (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii.* Podem ser observadas hiperemia e marginação de leucócitos nos vasos sanguíneos da derme. (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Evidencia um infiltrado inflamatório moderado de polimorfonucleares na derme. HE. Aumento: 40x (A, B, C) e 100x (D).

TABELA 1 – Avaliação dermatohistológica após um dia de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo

DIA 1	C			CV			T1			T2		
	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus
presença de crosta serocelular	3,0	-	-	2,0	-	-	3,0	-	-	3,0	-	-
necrose	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0	3,0	2,0	1,0
infiltrado mononucleares	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
infiltrado polimorfonucleares	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0
hemorragia	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0
hiperemia	-	2,0	1,0	-	1,0	0,0	-	1,0	0,0	-	2,0	0,0
proliferação vascular	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0

epi = epiderme; der = derme; mus = muscular (panículo carnoso)

No terceiro dia, microscopicamente, já era possível perceber características da fase proliferativa como a reepitelização, presença de fibroblastos e neovascularização. Entretanto, as características da fase inflamatória persistiam em todos os grupos, como o infiltrado inflamatório, predominantemente polimorfonuclear e as alterações vasculares, como a hemorragia e hiperemia. Os grupos C e CV, apesar de possuírem crostas serocelular cobrindo a epiderme, apresentavam reepitelização fechando toda extensão da ferida. Já os grupos tratados com o óleo de *C. langsdorffii* diluído em óleo mineral (T1) ou com o óleo de *C. langsdorffii* puro (T2) a reepitelização não foi percebida, como pode ser observado na Figura 5 e Tabela 2. No panículo carnoso de todos os grupos já era possível encontrar sinais de reparo, como por exemplo, a formação de células gigantes musculares e a proliferação fibroblástica (Anexo). Apesar disso ainda existiam focos de necrose em algumas fibras musculares.

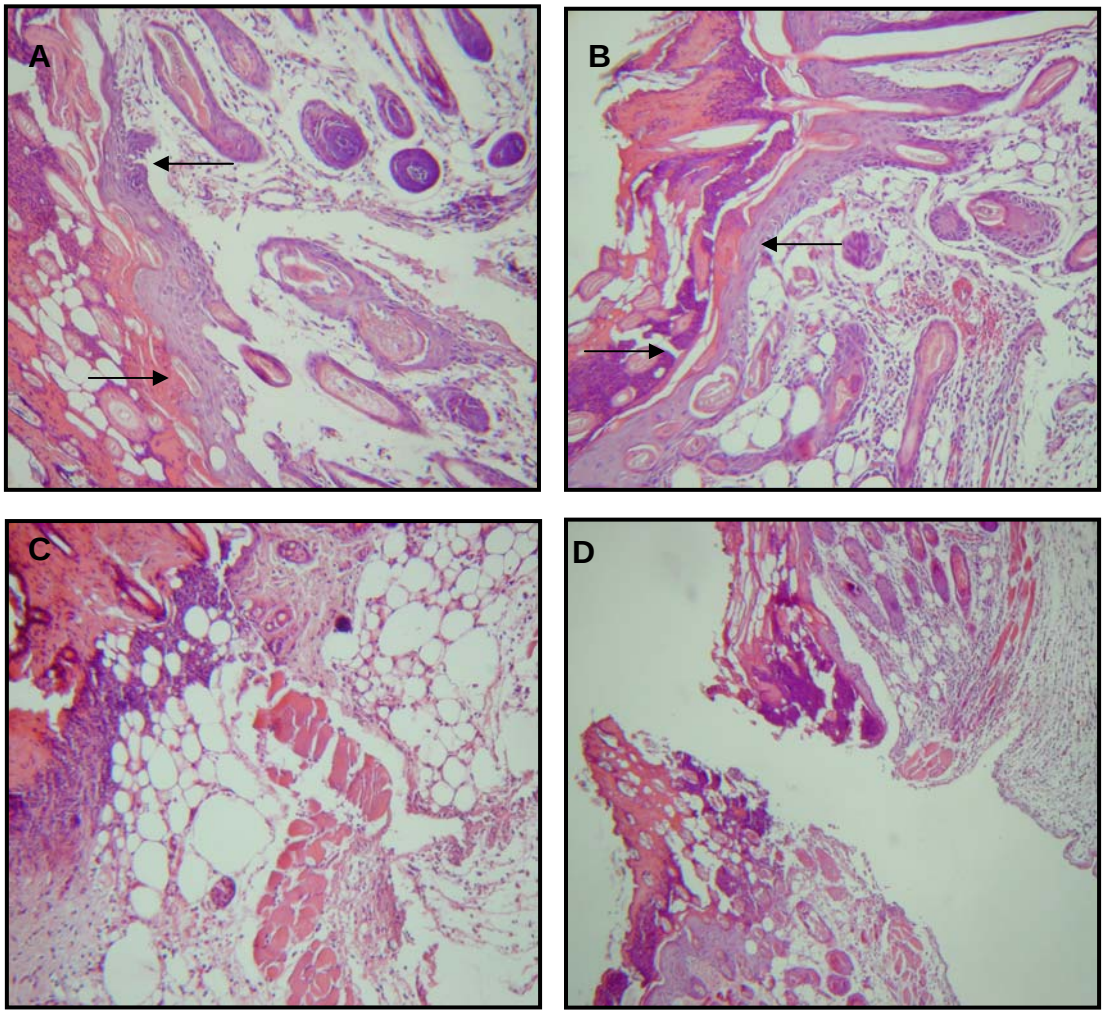

FIGURA 5 – Fotomicrografias da pele de camundongos três dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Pode ser observado a presença de crosta serocelular na epiderme em todos os grupos, porém, nas imagens (A) e (B) nota-se a presença de reepitelização da epiderme abaixo da crosta (seta). Nas imagens (C) e (D) percebem se a falta de reepitelização. As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. HE. Aumento: 10x (C, CV, T1) e 5x (T2).

TABELA 2 – Avaliação dermatohistológica após três dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo

DIA 3	C			CV			T1			T2		
	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus
presença de crosta serocelular	3,0	-	-	2,0	-	-	2,0	-	-	3,0	-	-
necrose	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0
infiltrado mononucleares	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
infiltrado polimorfonucleares	0,0	2,0	1,0	0,0	2,0	2,0	0,0	2,0	2,0	0,0	2,0	2,0
hemorragia	2,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
hiperemia	-	2,0	1,0	-	2,0	1,0	-	2,0	1,0	-	2,0	2,0
proliferação vascular	-	1,0	1,0	-	1,0	0,0	-	1,0	0,0	-	1,0	1,0

epi = epiderme; der = derme; mus = muscular (panículo carnoso)

Avaliando as feridas cirúrgicas aos cinco dias, foi possível perceber que os animais tratados com o óleo, tanto no grupo T1 quanto no T2, apresentavam edema e hiperemia de maior intensidade e permanência de crostas. Na microscopia apenas os grupos C e CV já apresentavam a reepitelização completa com hiperplasia das células da epiderme. Os grupos T1 e T2, além de apresentar reepitelização parcial, permaneciam com crostas sobre a epiderme, como é demonstrado na Figura 6. Todos os grupos permaneciam com proliferação fibroblástica, tanto na derme quanto no panículo carnoso, e também com sinais regeneração muscular. As alterações vasculares macroscópicas do grupo T1 e T2 foram confirmadas na microscopia. Esses grupos apresentavam hiperemia moderada na derme e panículo carnoso, e o grupo T2 ainda possuía hemorragia na derme de maior intensidade que os outros grupos. Nesse ponto experimental o infiltrado inflamatório se modificou. Nos grupos C e CV, apesar de discreta, era predominante a presença de mononucleares, enquanto nos grupos T1 e T2 as células inflamatórias foram encontradas aproximadamente na mesma proporção de mono e polimorfonucleares, e com maior intensidade que nos outros grupos, como pode ser observado nas Figuras 7 e 8 e na Tabela 3.

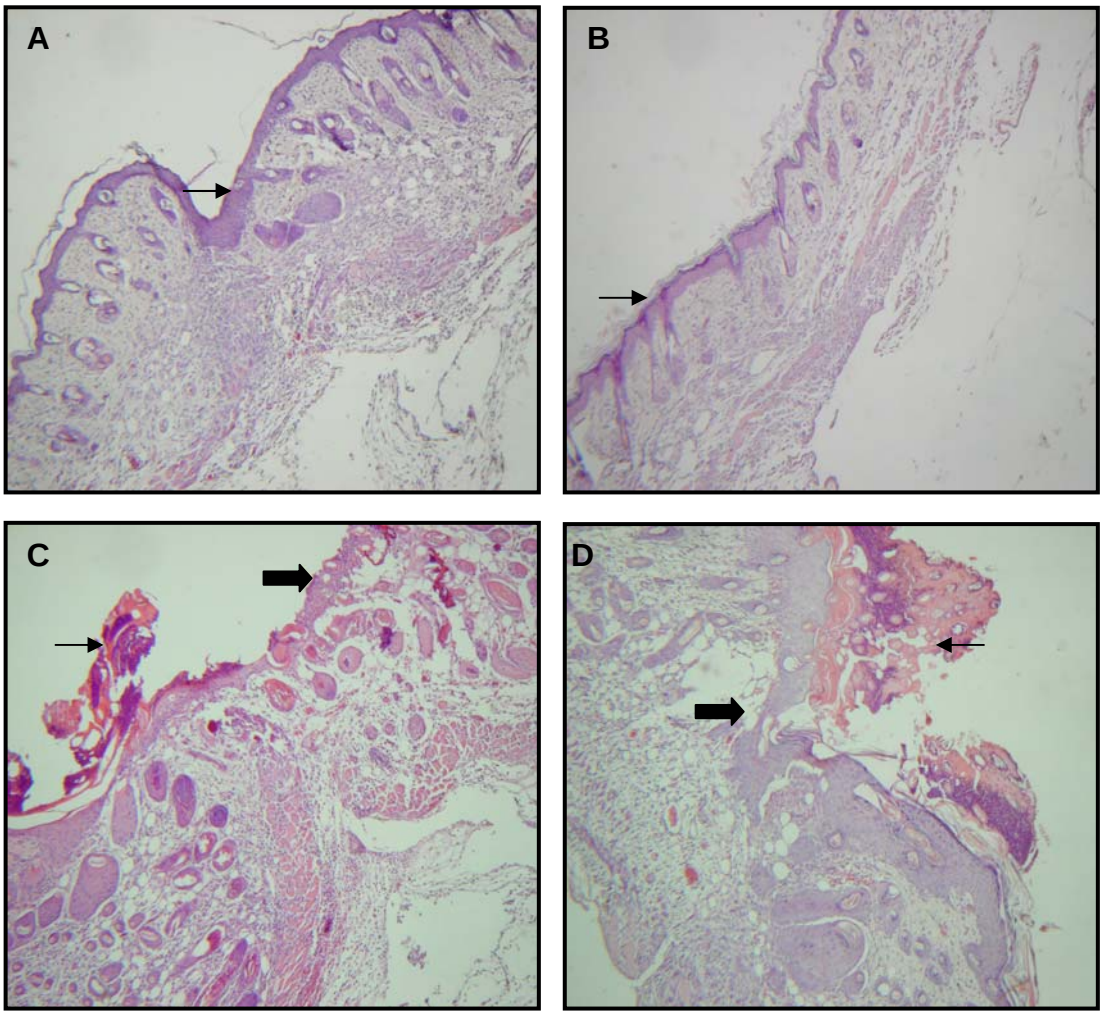

FIGURA 6 – Fotomicrografias da pele de camundongos cinco dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. As imagens (A) e (B) apresentam a incisão completamente reepitelizada com áreas de hiperplasia no epitélio pavimentoso estratificado, sem áreas de crostas sobre a epiderme (seta). Nas imagens (C) e (D), ainda não havia reepitelização total (seta larga), havia presença de crostas serocelular (seta) sobre a epiderme. As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. HE. Aumento: 10x.

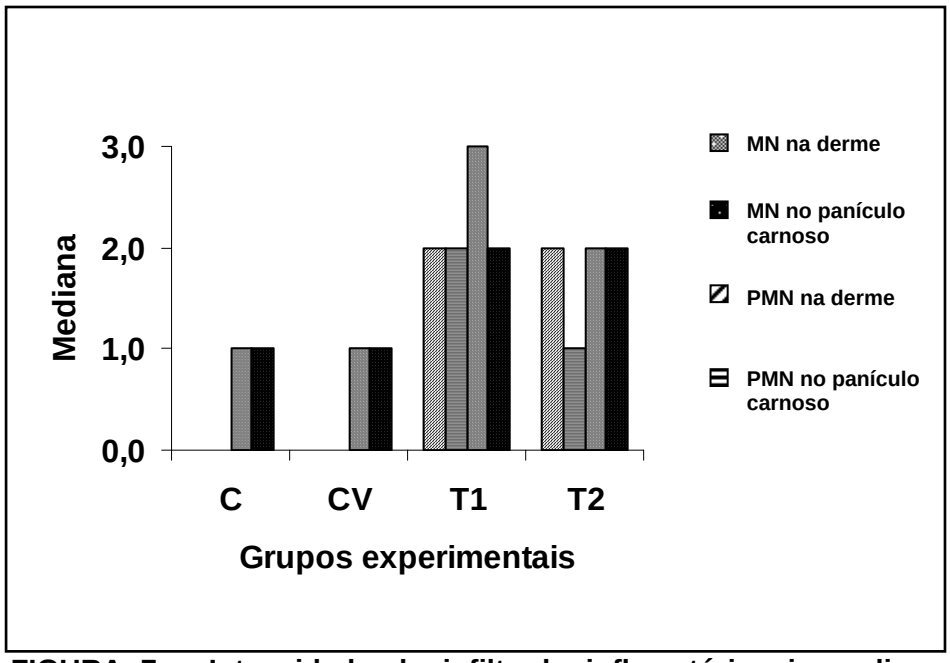

FIGURA 7 – Intensidade do infiltrado inflamatório cinco dias após a incisão cirúrgica. O gráfico apresenta a intensidade do infiltrado inflamatório encontrado no histopatológico da pele do dorso de camundongos BALB/c que foram tratados topicamente, durante cinco dias com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Os grupos C e CV apresentam infiltrado inflamatório discreto predominantemente de mononucleares tanto na derme, quanto no panículo carnoso. Os grupos T1 e T2 apresentam infiltrado inflamatório misto e em maior intensidade que os outros grupos. Os valores do gráfico correspondem a mediana entre o grupo (n=3) para cada um dos tratamentos. MN = mononucleares e PMN = polimorfonucleares.

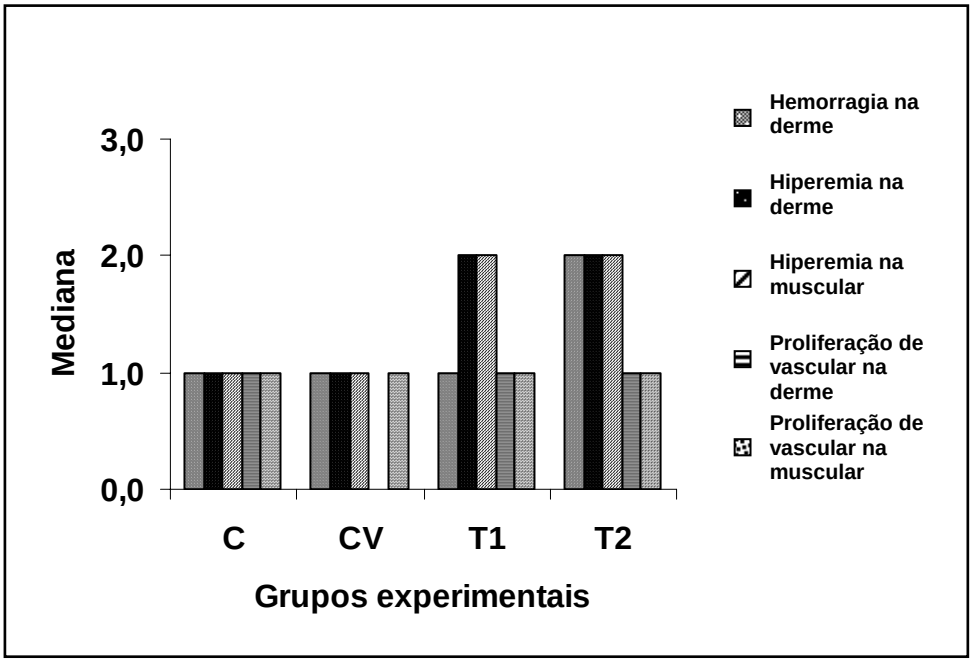

FIGURA 8 – Intensidade das alterações vasculares cinco dias após a incisão cirúrgica. O gráfico apresenta a intensidade das alterações vasculares encontradas no histopatológico da pele do dorso de camundongos BALB/c que foram tratados topicamente, durante cinco dias, com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Os grupos C e CV apresentam hemorragia discreta na derme e hiperemia discreta na derme e panículo carnoso. Os grupos T1 e T2 apresentam hiperemia moderada na derme e panículo carnoso. Além disso, o grupo T2 apresenta a hemorragia moderada na derme enquanto nos outros grupos a hemorragia era discreta. A proliferação vascular é similar entre os grupos. Os valores do gráfico correspondem a mediana entre o grupo (n=3) para cada um dos tratamentos. Muscular = panículo carnoso.

TABELA 3 – Avaliação dermatohistológica após cinco dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo

DIA 5	C			CV			T1			T2		
	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus
presença de crosta serocelular	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	2,0	-	-
necrose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
infiltrado mononucleares	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	3,0	2,0	0,0	2,0	2,0
infiltrado polimorfonucleares	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	2,0	1,0
hemorragia	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	2,0	1,0
hiperemia	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	2,0	2,0	-	2,0	2,0
proliferação vascular	-	1,0	1,0	-	0,0	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0

epi = epiderme; der = derme; mus = muscular (panículo carnoso)

Macroscopicamente, aos sete dias, os grupos T1 e T2 apresentavam aspecto da ferida prejudicado em relação aos outros grupos, pois, a pele desses animais estava mais hiperêmica e edemaciada e, além disso, possuía crostas cobrindo o local da lesão (Anexo). Na microscopia, foi possível perceber que as alterações vasculares eram similares entre os grupos, pois todos eles apresentavam hemorragia e hiperemia discreta (Tabela 4). A epiderme, apesar de estar reepitelizada, nos grupos T1 e T2, ainda permanecia coberta por crostas, como mostra a Figura 9. Em todos os animais, independente do tratamento, o processo de reparo da muscular já apresentava miotubos com núcleos centrais e proliferação fibroblástica, caracterizando regeneração por brotamento do panículo carnoso (Figura 10). Os grupos que possuíam tratamento com o óleo (T1 e T2) apresentavam o infiltrado inflamatório mais acentuado.

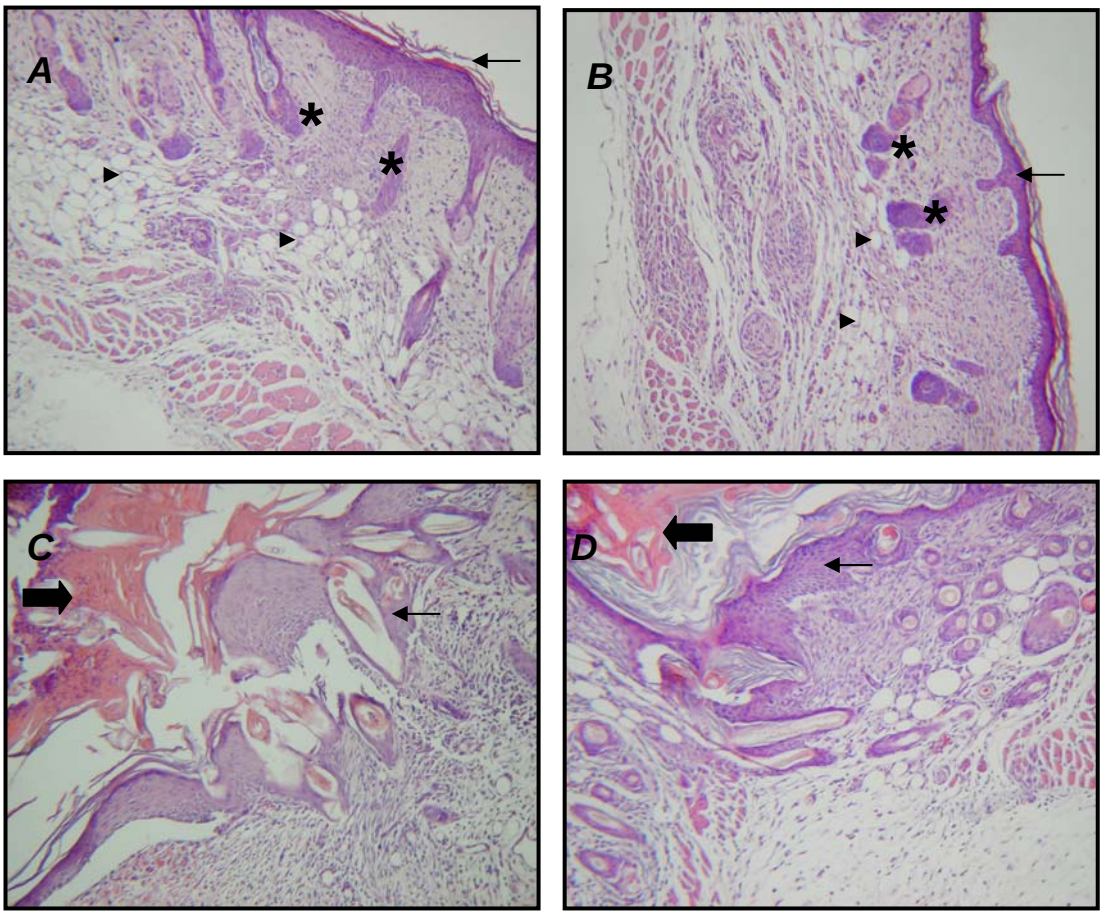

FIGURA 9 – Fotomicrografias da pele de camundongos sete dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril. Note que os grupos C e CV, apresentavam-se no final da fase proliferativa, com a incisão completamente reepitelizada com pequenas áreas de hiperplasia no epitélio pavimentoso estratificado (seta). Crescimento de anexos (asterisco) e desenvolvimento da hipoderme também podia ser observado (cabeça de seta). (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Observe que nos grupos T1 e T2, apesar de haver reepitelização quase total, ainda havia uma desorganização da epiderme (seta) e a presença de crosta serocelular (seta larga). As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. HE. Aumento: 10x.

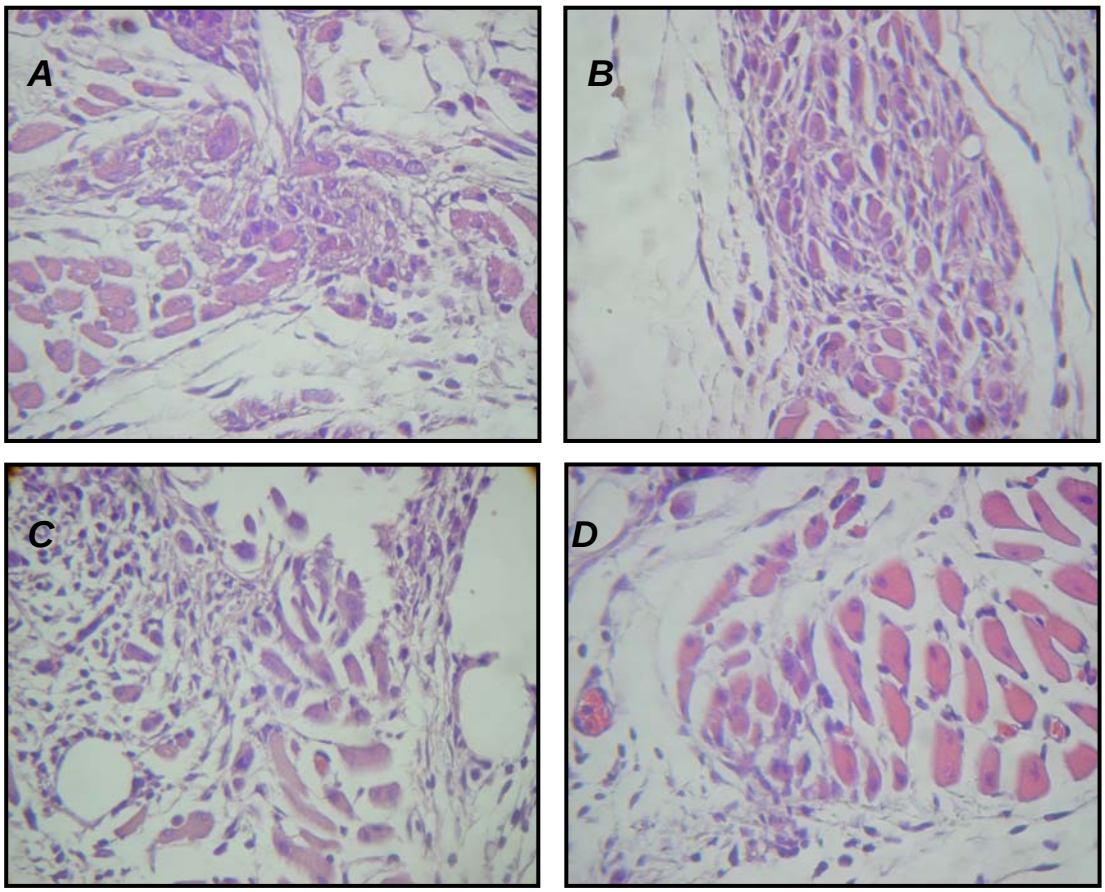

FIGURA 10 – Fotomicrografias do processo de reparo do panículo carnoso de camundongos sete dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Todos os grupos apresentavam reparo do panículo carnoso com proliferação de fibroblastos e regeneração de miotubos. Note a presença de fibrose e miotubos delgados e alguns deles com núcleos centrais. As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. HE. Aumento: 40x.

TABELA 4 – Avaliação dermatohistológica após sete dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo

DIA 7	C			CV			T1			T2		
	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus
presença de crosta serocelular	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	2,0	-	-
necrose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
infiltrado mononucleares	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	3,0	2,0	0,0	2,0	2,0
infiltrado polimorfonucleares	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
hemorragia	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0
hiperemia	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0
proliferação vascular	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0	1,0

epi = epiderme; der = derme; mus = muscular (panículo carnoso)

No último ponto experimental, quatorze dias depois da incisão cirúrgica, os aspectos macroscópicos dos grupos C e CV eram semelhantes, mas em relação aos grupos T1 e T2, apesar da ferida estar completamente fechada e sem crostas, a pele desses animais estava espessada, principalmente no grupo tratado com o óleo puro. Microscopicamente, o que pôde ser observado no grupo T2 foram dobras na epiderme, mostrando uma certa desorganização do tecido de reparo, como pode ser observado na Figura 11. Além disso, o infiltrado inflamatório na derme era discreto nos grupos C e CV e moderado nos outros grupos. Nessa fase, o processo de reparo já encontrava-se em remodelação e, por isso, quase não se observou hiperemia e proliferação vascular em nenhum dos grupos. Macro e microscopicamente o local da incisão já era praticamente imperceptível em relação à área saudável, porém a derme do grupo T2, aparentemente, apresentava na microscopia fibrose mais acentuada do que nos outros grupos (Tabela 5). Todos os grupos, independente do tratamento, possuíam sinais de regeneração e fibrose na muscular (Figura 12).

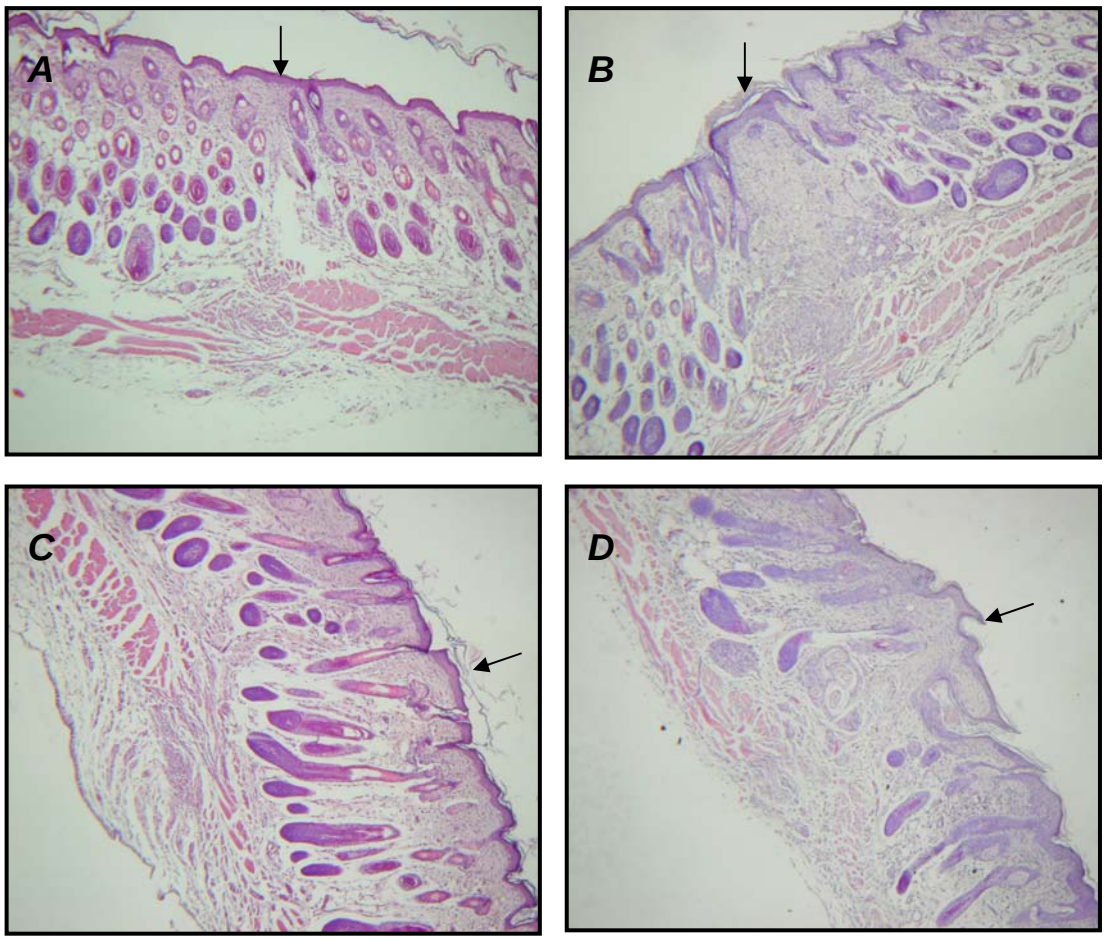

FIGURA 11 – Fotomicrografias da pele de camundongos quatorze dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Note na área da incisão cirúrgica (seta) a desorganização na epiderme dos grupos T1 e T2. Na imagem (D), nota-se que existem dobras na epiderme e derme. As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. Aumento: 5x. HE.

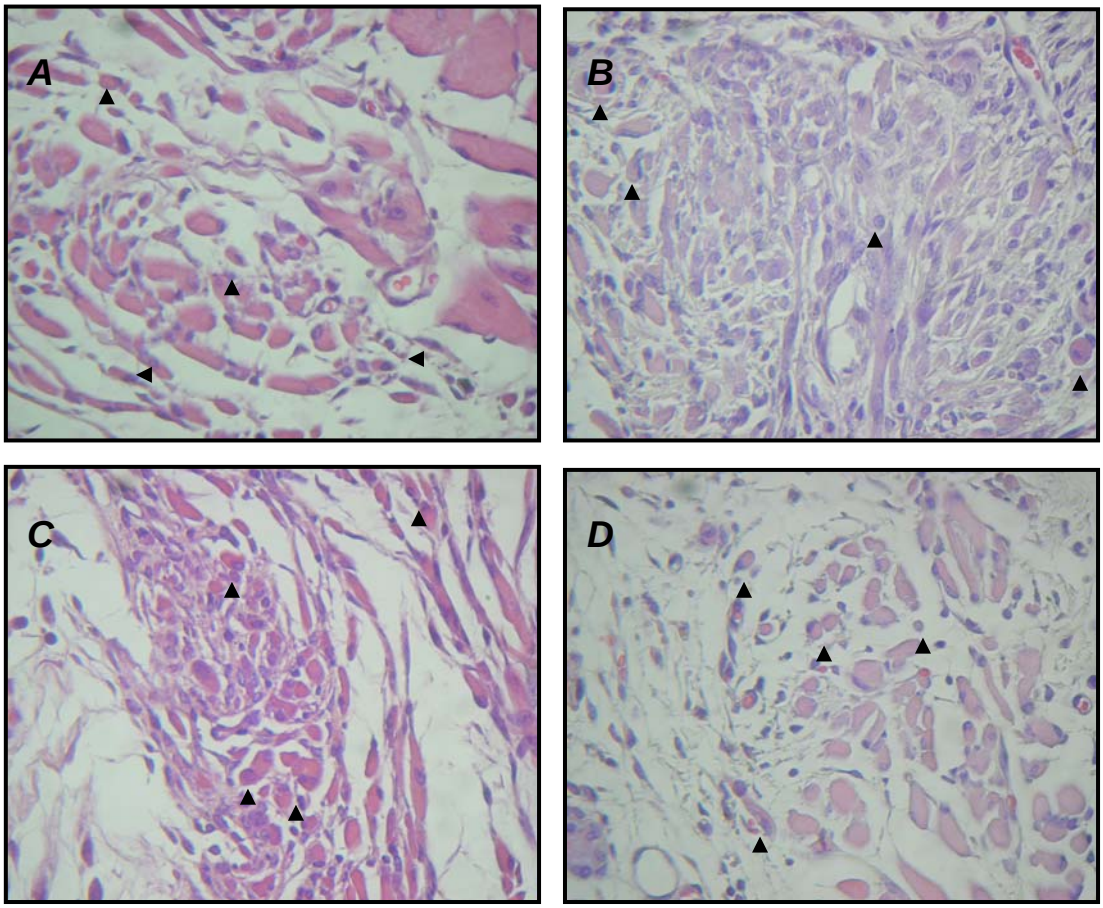

FIGURA 12 – Fotomicrografias do processo de reparo do panículo carnoso de camundongos quatorze dias após a incisão cirúrgica. (A) grupo controle, tratado topicamente com solução salina estéril, (B) grupo controle veículo, tratado com óleo mineral estéril, (C) grupo tratado 1, tratado com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e (D) grupo tratado 2, tratado com óleo de *C. langsdorffii* puro. Todos os grupos apresentavam reparo do panículo carnoso com proliferação de fibroblastos e regeneração de miotubos. Note a presença de fibrose, como na fotomicrografia (B), e miotubos delgados (cabeça de seta) e alguns deles com núcleos centrais (A,B,C e D). As imagens correspondem a um campo representativo de animal por grupo. Aumento: 40x. HE.

TABELA 5 – Avaliação dermatohistológica após quatorze dias de tratamento tópico das lesões cirúrgicas com solução salina estéril (C), óleo mineral estéril (CV), diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* (T1) e óleo de *C. langsdorffii* puro (T2). Mediana de três animais por grupo

DIA 14	C			CV			T1			T2		
	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus
presença de crosta serocelular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
necrose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
infiltrado mononucleares	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0	0,0	2,0	1,0
infiltrado polimorfonucleares	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
hemorragia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
hiperemia	-	1,0	0,0	-	0,0	0,0	-	1,0	0,0	-	1,0	0,0
proliferação vascular	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	1,0	0,0

epi = epiderme; der = derme; mus = muscular (panículo carnoso)

5.2 Avaliação do perfil de migração celular para corpo estranho

Na avaliação do perfil de migração celular para corpo estranho em camundongos isogênicos do grupo controle, que receberam tratamento tópico nas lesões cirúrgicas com solução salina estéril, percebeu-se que a lamínula, quando era retirada da região subcutânea correspondente, estava coberta por fibrina e grande quantidade de células fixadas, que eram evidenciadas após a coloração. Ao primeiro dia, as células predominantes eram polimorfonucleares neutrófilos, com raros monócitos ou macrófagos. A partir do terceiro dia, as células que mais estavam presentes no corpo estranho e que passavam a ser dominantes no processo eram os macrófagos. Apesar de ainda serem encontrados muitos neutrófilos, bastonetes e neutrófilos mortos. Já nesse ponto experimental, foram encontradas poucas células gigantes multinucleadas, como resultado da fusão de macrófagos. A partir daí, o número dessas células passou a ser crescente, como visto ao quinto, sétimo e décimo quarto dias e, como conseqüência, ocorre uma leve diminuição no número de macrófagos. A cinética de migrações celulares está demonstrada na Figura 13.

Outro fato comum na avaliação dos corpos estranhos era a existência de macrófagos, com vesículas citoplasmáticas e diferentes morfologias nucleares, bem como a presença de fibroblastos, linfócitos, alguns mastócitos, e células gigantes com diferentes quantidades e disposições dos núcleos (Figura 14).

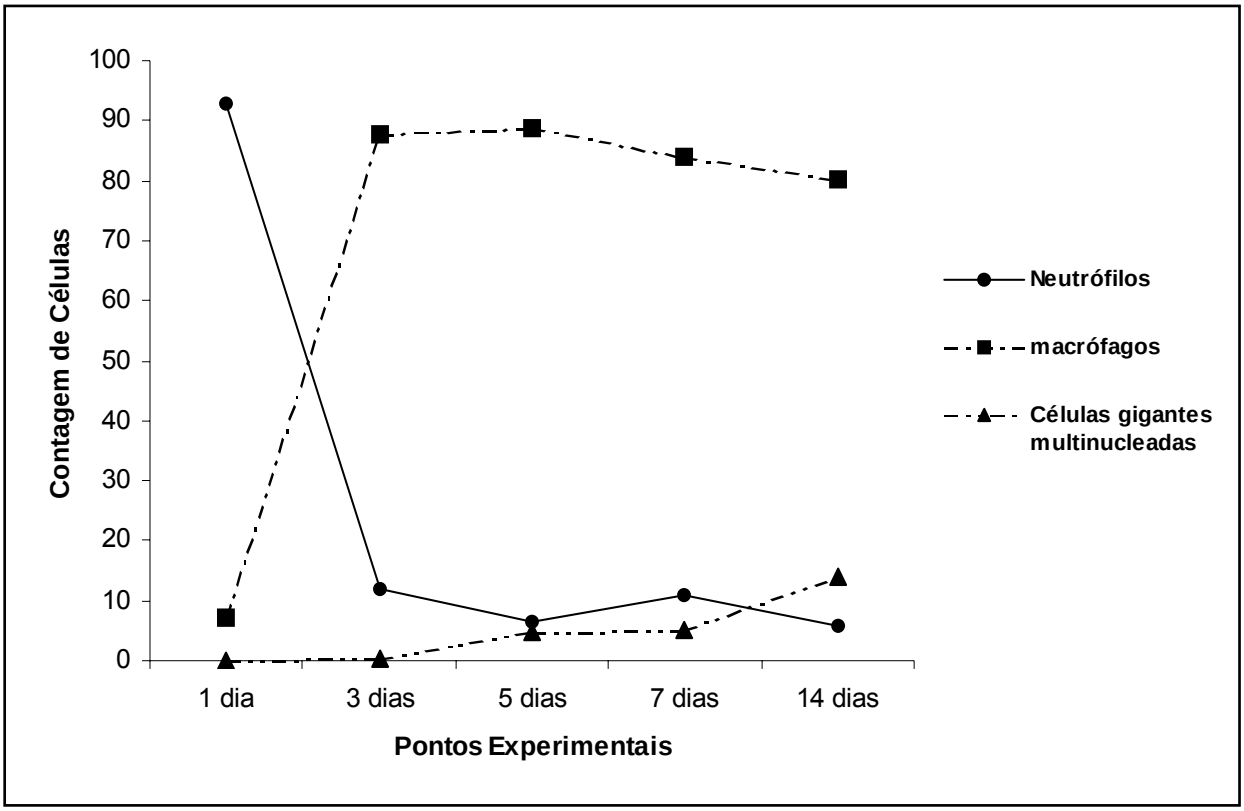

FIGURA 13 – Cinética de migração celular para corpo estranho. O gráfico apresenta a cinética de migração celular de neutrófilos, macrófagos e células gigantes para lamínula de vidro (12 mm de diâmetro) implantada no tecido subcutâneo de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, tratados com solução salina estéril (grupo controle), em diferentes pontos experimentais (n=6 em cada ponto experimental).

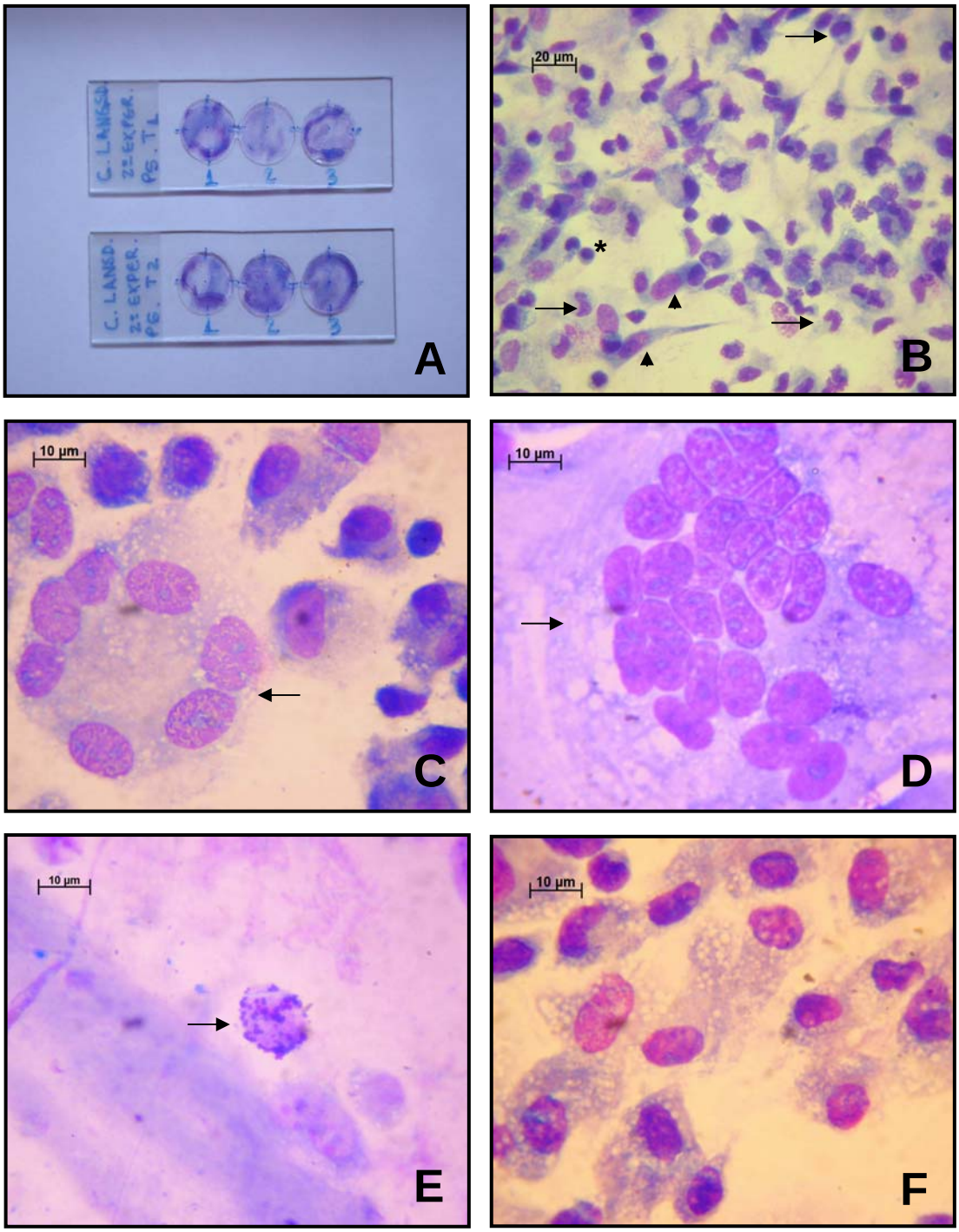

FIGURA 14 – Avaliação do perfil de migração celular para corpo estranho. A imagem (A) apresenta seis lamínulas que foram implantadas no espaço subcutâneo do dorso de diferentes camundongos BALB/c. Na imagem (B) podem ser observados os diferentes tipos celulares que migraram e fixaram no corpo estranho, como por exemplo, os macrófagos (seta), fibroblastos (cabeça de seta) e linfócito (asterisco). Nas imagens (C) e (D) podem ser observadas diferentes morfologias de células gigantes multinucleadas (seta). Na imagem (E) observa-se um mastócito (seta) e na (F) macrófagos com diferentes morfologias nucleares e vesículas intracitoplasmáticas. Método de coloração rápida Instant Prov – Newprov® (B,C, D, E e F).

5.3 Influência de diferentes tratamentos tópicos no perfil de migração celular

Depois de conhecer o perfil de migração celular para lamínula de vidro quando as lesões cirúrgicas eram tratadas com solução salina estéril (C), outros tratamentos foram estabelecidos para verificar se um tratamento tópico é capaz de alterar o perfil de migração das células inflamatórias. Através da cinética de migração celular pretendia-se avaliar o poder antiinflamatório do óleo resina de *Copaifera langsdorffii.*

Os resultados encontrados no primeiro dia após o implante do corpo estranho mostraram uma alteração no perfil de migração celular quando os tratamentos tópicos foram realizados. As diferenças significativas ($p<0,05$) na migração de neutrófilos e macrófagos existiam tanto entre os grupos C e CV quanto entre o grupo C e os grupos T1 e T2, como pode ser visto na Figura 15. Os perfis de migração celular nos outros pontos experimentais não foram alterados como mostram as Figuras 16, 17 e 18.

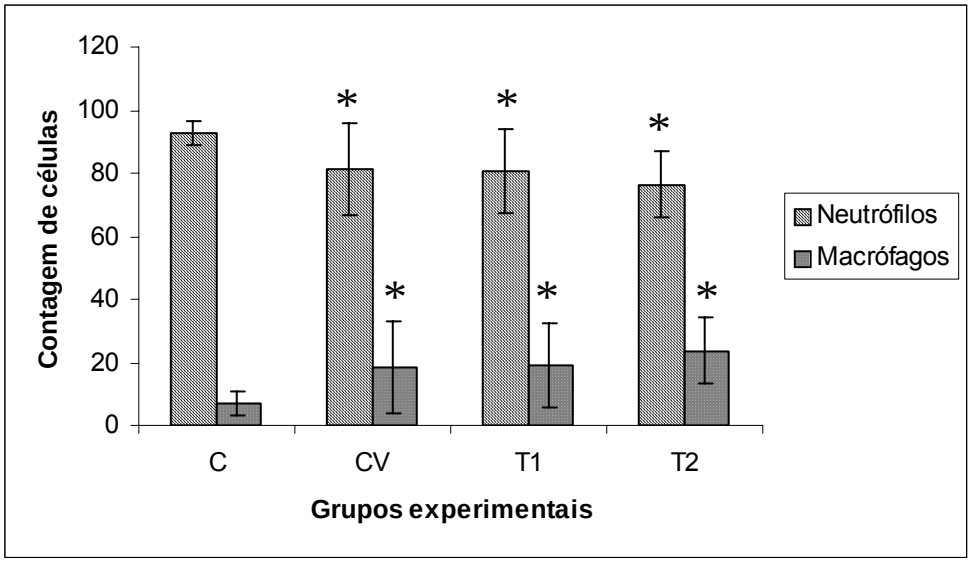

FIGURA 15 – Perfil de migração celular para corpo estranho um dia após o implante. O perfil de migração celular foi determinado após duas contagens de células que fixaram na lamínula de vidro (12 mm de diâmetro) implantada no tecido subcutâneo de camundongos da linhagem BALB/c com um dia de tratamento. O grupo C recebeu tratamento tópico com solução salina estéril, CV óleo mineral estéril, T1 recebeu uma diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e T2 óleo de *C. langsdorffi* puro.* Diferença significativa quando comparado com o controle, $p<0,05$. (n=6 em cada grupo experimental)

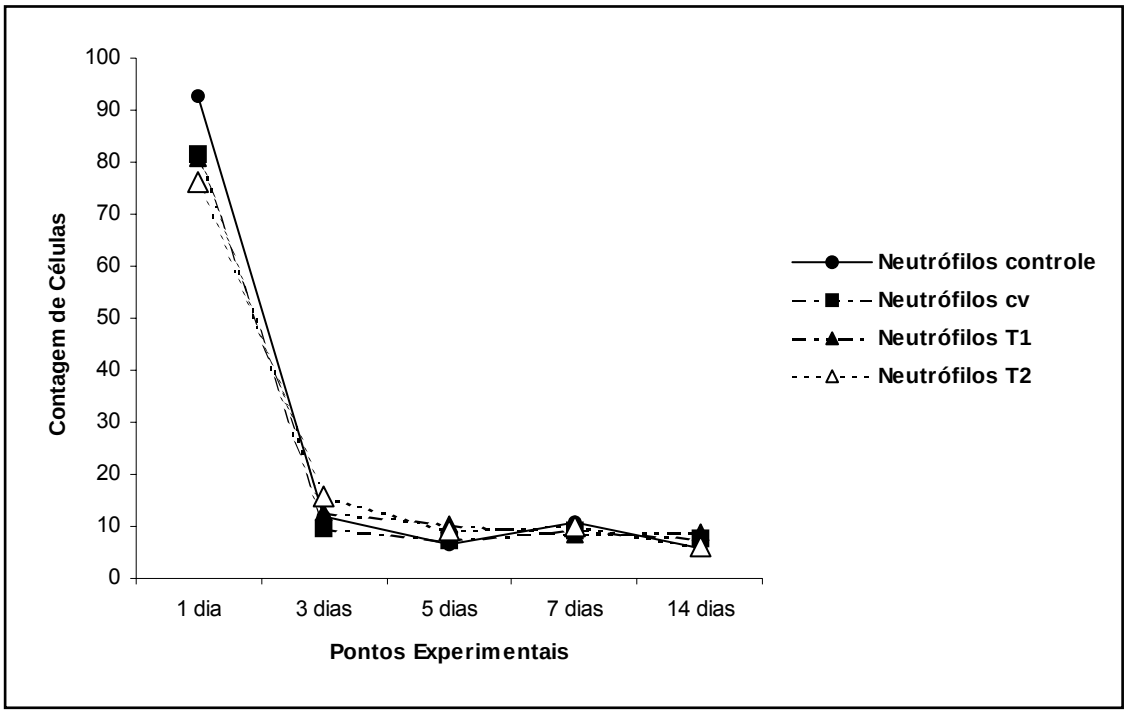

FIGURA 16 – Cinética de migração de neutrófilos para corpo estranho do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento. O perfil de migração celular foi determinado após duas contagens de células que fixaram na lamínula de vidro (12 mm de diâmetro) implantada no tecido subcutâneo de camundongos da linhagem BALB/c que receberam diferentes tratamentos tópicos. O grupo C recebeu tratamento tópico com solução salina estéril, o CV foi tratado com óleo mineral estéril, T1 com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e T2 com óleo de *C. langsdorffi* puro. (n=6 em cada grupo experimental).

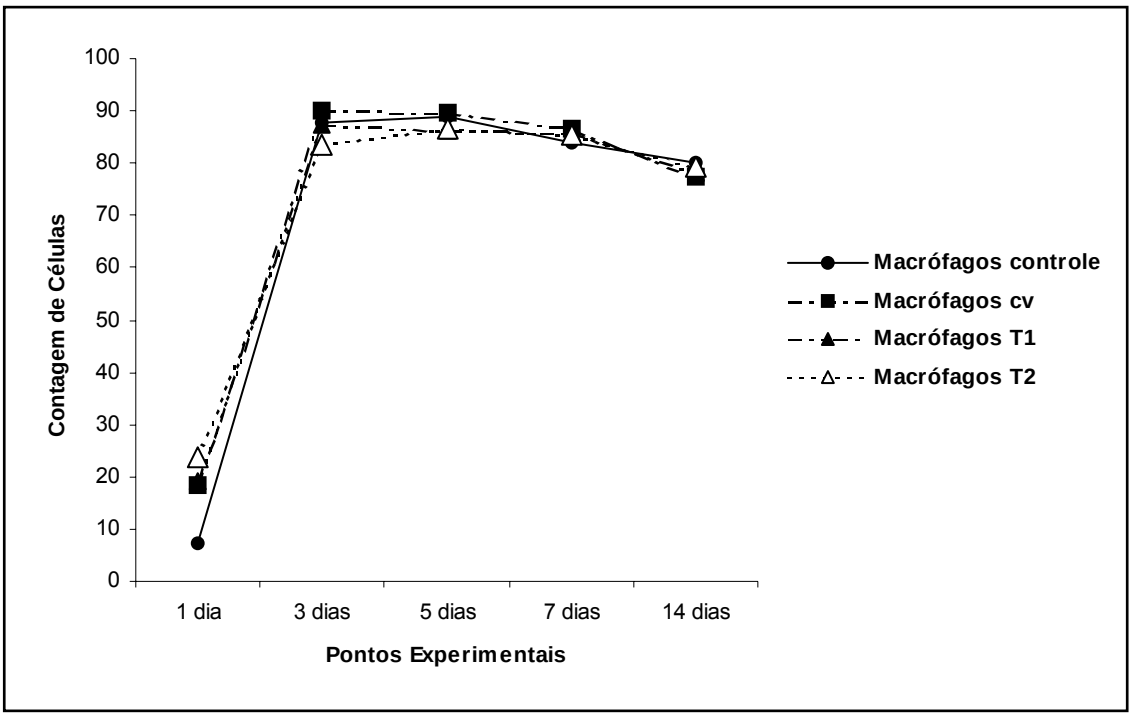

FIGURA 17 – Cinética de migração de macrófagos para corpo estranho do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento. O perfil de migração celular foi determinado após duas contagens de células que fixaram na lamínula de vidro (12 mm de diâmetro) implantada no tecido subcutâneo de camundongos da linhagem BALB/c que receberam diferentes tratamentos tópicos. O grupo C recebeu tratamento tópico com solução salina estéril, o CV foi tratado com óleo mineral estéril, T1 com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e T2 com óleo de *C. langsdorffi* puro. (n=6 em cada grupo experimental).

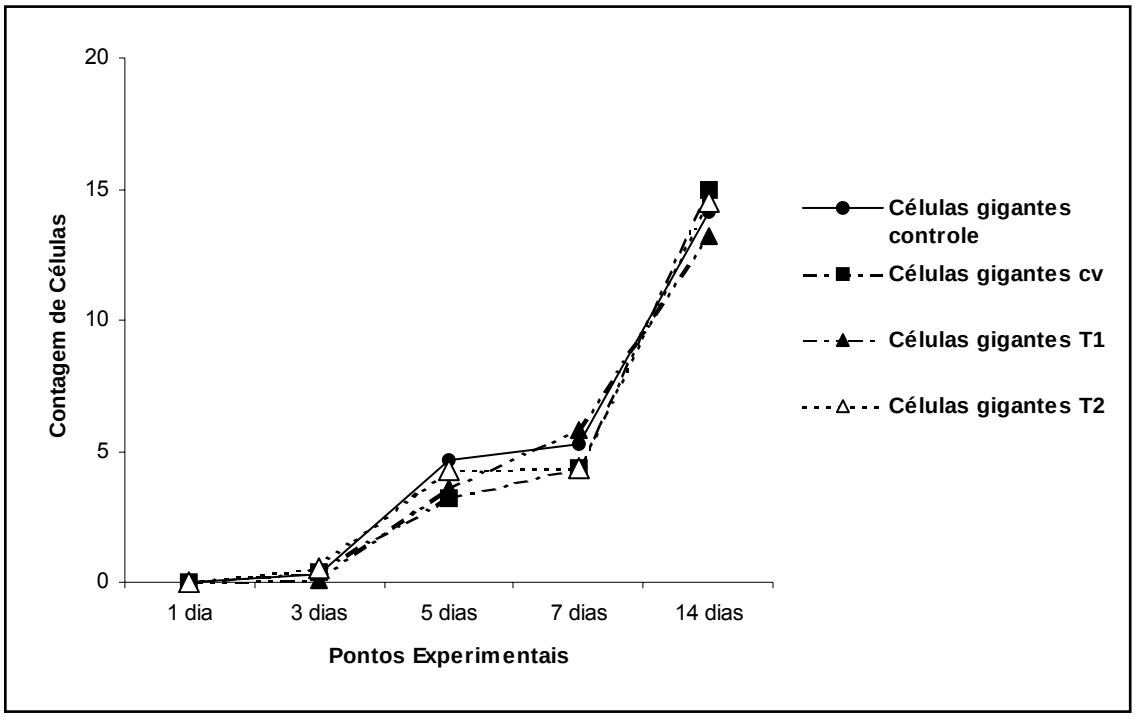

FIGURA 18 – Formação de células gigantes multinucleadas em corpo estranho, do primeiro ao décimo quarto dia de tratamento. O perfil de formação de células gigantes multinucleares foi determinado após duas contagens de células que fixaram na lamínula de vidro (12 mm de diâmetro) implantada no tecido subcutâneo de camundongos da linhagem BALB/c que receberam diferentes tratamentos tópicos. O grupo C recebeu tratamento tópico com solução salina estéril, o CV foi tratado com óleo mineral estéril, T1 com diluição (v:v) de óleo mineral estéril e óleo de *C. langsdorffii* e T2 com óleo de *C. langsdorffi* puro. (n=6 em cada grupo experimental).

6. DISCUSSÃO

Apesar do óleo de *C. langsdorffii* ser muito utilizado no tratamento de feridas, o efeito do tratamento tópico com este óleo medicinal tem sido pouco investigado. Embora a medicina popular defenda a utilização desse óleo para o tratamento de feridas, tanto para homens como para animais, e ainda exista o fato de que nem sempre os resultados encontrados em uma espécie possam ser extrapolados para outra, nos resultados apresentados em camundongos percebe-se que, a utilização do óleo de *C. langsdorffii* no tratamento de feridas cirúrgicas, gerou um efeito deletério dos tratamentos cutâneos. Em suma, as feridas cirúrgicas de primeira intenção tratadas com o óleo de *C. langsdorffii* apresentaram retardo no processo de reepitelização, permanência de crostas e ainda a persistência das alterações vasculares e inflamatórias.

Quando a epiderme foi avaliada pôde-se perceber que, camundongos tratados com o óleo de *C. langsdorffii,* apresentavam dificuldade no restabelecimento da continuidade do epitélio e também permaneciam por mais tempo com a crosta serocelular no local da ferida. Esses achados microscópicos mostraram que, apesar de o aspecto macroscópico da ferida linear estar fechado, a epiderme não estava completamente formada, o que poderia facilitar contaminações e, possivelmente, deiscência de ferida. Segundo MARTINEZ-HERNANDEZ (2002), a reepitelização tem um importante papel no processo de reparação, pois através da proliferação e hiperplasia das células epiteliais a continuidade do tecido é restabelecida. Aos quatorze dias, todos os grupos apresentavam fechamento completo da epiderme, porém o grupo T2 possuía dobras na camada epitelial e desorganização do tecido cicatricial. Esse mesmo grupo possuía mais fibrose no local da incisão, assim como uma ferida com maior dificuldade de controlar a produção e remodelação do colágeno, devido a alguma desordem na formação do tecido de granulação, como sugerido por MANDELBAUM et al., (2003).

A presença de crosta nos grupos T1 e T2 durante um período mais longo nas lesões foi um fato marcante nos resultados. De acordo com MULLER & KIRK'S (1995), a crosta é uma massa ressecada e consolidada na superfície da ferida, composta de uma combinação de queratina, soro, debris celulares e,

freqüentemente, restos de microorganismos. Quando esta se apresenta formada principalmente por soro e restos de células inflamatórias deve ser chamada de crosta serocelular (Figura 2). No exame histopatológico da pele aos cinco dias, além da reepitelização parcial da epiderme e da presença de crosta serocelular sobre a incisão, na derme dos animais tratados com óleo, também era maior a incidência de células inflamatórias e alterações vasculares, como hemorragia e hiperemia. Macroscopicamente, a pele dos animais do grupo T1 e T2 mantinham sinais de inflamação como, edema e hiperemia, até os sete dias do processo.

Esta permanência da fase inflamatória pode estar associada à presença de crostas e conseqüente falta da reconstituição da epiderme, podendo facilitar a contaminação da ferida. Em virtude da presença de microorganismos o sistema imune inato permanece ativado, mais células migram em direção ao foco da lesão e mais citocinas proinflamatórias são produzidas. Essas células produzem constantemente quimiocinas para atrair mais células inflamatórias e substâncias vasoativas, além de radicais reativos de oxigênio e nitrogênio, que são lançados no microambiente da inflamação. Além disso, o influxo de neutrófilos e macrófagos para essa região aumenta a demanda por oxigênio, com conseqüente elevação das concentrações de ácido lático e queda do pH. Essa combinação de hipóxia, baixo pH e altas concentrações de ácido lático ativa os macrófagos para a síntese de fatores de crescimento, como o TGF-β, um importante estimulador de síntese de matriz extracelular e proliferação fibroblástica, porém que interfere de forma negativa na reepitelização (BALBINO et al., 2005).

Corroborando nossos dados, BRITO et al. (1998) e BRITO et al. (1999), avaliando em ratos a macro e microscopia de feridas tratadas com o óleo de *Copaifera reticulata* encontraram persistência de hiperemia até os quatorze dias, maior área das feridas e a permanência de crostas por um período mais longo do que nos animais controle tratados com solução salina. Esses autores relatam que as lesões de pele que receberam o óleo puro estavam cobertas por material de espessura variável, constituída de leucócitos, restos de hemácias e fibrina. Além disso, apresentavam retardo na reepitelização, maior quantidade de células inflamatórias e hiperemia dos vasos sanguíneos. Essas alterações estavam presentes em nossos resultados, em maior ou menor grau, de acordo com o estágio da ferida e o tipo de tratamento realizado (Figuras 3 e 7). Apesar

de se tratar de espécies diferentes do gênero *Copaifera,* os resultados encontrados são similares, o que talvez seja pelo fato de ambas as espécies terem proximidades na constituição química, como foi verificado por VEIGA Jr. & PINTO (2002).

Apenas um estudo, com o objetivo de avaliar a influência da *C. langsdorffii* no processo de cicatrização, foi encontrado. Esse estudo foi realizado por PAIVA et al. (2002), que para isto, avaliaram a contração e a força de tensão da ferida em ratos. Estabeleceram tratamentos diários com solução salina para o controle e duas concentrações diferentes do óleo (2% e 4%) para os tratamentos. Dois diferentes modelos de feridas foram produzidos, uma completa de 2 cm^2 e outra linear de 4 cm. Os resultados mostraram que o tratamento com o óleo aumentou a força de tensão e a contração da ferida nos dias nove e cinco de tratamento, sendo que nos outros dias de avaliação não houve diferença entre os grupos. Esses autores não descreveram as alterações macro e microscópicas das lesões, e assim mesmo, relacionaram seus resultados à formação de tecido de granulação e à ação de miofibroblastos. Além disso, concluem que o tratamento com o óleo pode ter um efeito benéfico, pois evita complicações de deiscência da ferida.

Um fato interessante é que além da proliferação fibroblástica nessa fase proliferativa, responsável pela aproximação das bordas da ferida, a reepitelização, a neovascularização e, até mesmo, eventos ligados à fase inflamatória, como a ativação celular, a síntese de citocinas e fatores de crescimentos, também são responsáveis pela formação do tecido de granulação. Isso porque apesar de o processo de reparo estar didaticamente dividido em fases, ele se desenvolve de maneira integrada e através de eventos interdependentes. Além do mais, a força de tensão, de acordo com STEENFOS (1994), MANDELBAUM et al. (2003), BALBINO et al. (2005) e DESMOULIÈRE et al. (2005), é um evento que ocorre tardiamente, na última fase do processo de reparação, na fase conhecida por remodelação, onde ocorrem reformulações da matriz extracelular pela ação da enzima metaloproteinase, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água, o que permite uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura.

A presença de polimorfos e mononucleares tem se mostrado de forma diferente de acordo como a concentração do tratamento, via de administração e órgão alvo. Nossos resultados demonstraram que o infiltrado inflamatório na pele, tanto dos animais tratados com o óleo de *C. langsdorffii* diluído em óleo mineral (v:v) quanto daqueles tratados com o óleo de *C. langsdorffii* puro, nos dias cinco e sete de tratamento, apresentava-se mais intenso do que nos grupos C e CV. PAIVA et al. (2002) e PAIVA et al. (2004a) administrando por via oral o óleo de *C. langsdorffii* em diferentes concentrações, ou o ácido caurenóico, um diterperno presente neste óleo, para ratos com colite induzida por ácido acético, mostraram que os animais tratados apresentavam menor infiltrado inflamatório na submucosa gástrica e conseqüentemente menor produção das enzimas MPO e MDA. Nestas ocasiões esses autores atribuíram a atividade antiinflamatória ao ácido caurenóico do óleo de *C. langsdorffii*, pois segundo CASTRILLO et al. (2001), esse diterpeno caureno inibe a atividade de transcrição do Fator Nuclear-kB (NF-kB), uma importante molécula envolvida no processo de ativação de macrófagos.

Entretanto, como neste estudo, quando os animais foram tratados com óleo de copaíba, o número de macrófagos que migraram para a lamínula no primeiro dia foi maior do que no controle. Isso sugere que as células foram ativadas e aumentaram a capacidade de migração para o corpo estranho. Além disso, quando as lamínulas eram banhadas no óleo antes de serem implantadas (dados do estudo piloto não apresentados) o que ocorria era que os macrófagos se mostravam globosos e com muitas vesículas citoplasmáticas, características essas de células com alta atividade fagocítica (RINGLER, 1997).

Um fato comum a todos os grupos foi o tipo de reparo que ocorreu no panículo carnoso. O desenvolvimento dessa reparação seguiu as fases descritas por McGAVIN (1998), ou seja, degeneração, necrose e regeneração. Apesar de a degeneração e a necrose, devido à incisão cirúrgica, terem variado entre discretas e moderadas, a evolução da reparação do músculo não foi influenciada pelos tratamentos. No local da reparação da musculatura pôde-se observar a proliferação de fibroblastos e também sinais de regeneração por brotamento, com a presença de células gigantes musculares, formação de miotubos delgados e disposição de núcleos centrais, porém nem sempre esse processo pôde ser

avaliado com clareza, uma vez que o tecido muscular é facilmente afetado por artefatos de técnicas, como afirmaram McGAVIN (1998) e McINNES (2005).

Para RODELLA et al. (2006), a presença de um corpo estranho no tecido faz com que macrófagos deixem de se envolver na cicatrização normal e passem a exercer a função de reconhecer superfícies estranhas, rompendo a seqüência de eventos do processo de reparo do tecido lesado. Entretanto, os resultados aqui apresentados mostraram que, apesar de existir uma lamínula no espaço subcutâneo próximo à incisão, a morfologia do tecido e o desenvolvimento do processo de reparo não foram alterados, estando as diferenças encontradas entre os grupos associadas ao tratamento e não a presença de corpo estranho.

Quando a lamínula era retirada do espaço subcutâneo do dorso do camundongo podia ser observado que a mesma estava coberta por fibrina e grande quantidade de células fixadas (Figura 14). Segundo ANDERSON (1988), durante o procedimento de implantação do corpo estranho uma injúria tecidual é causada e vários sistemas enzimáticos são ativados, como por exemplo, o sistema de coagulação, complemento, fibrinolítico e de cininas, despertando uma reação inflamatória no local. Isso resulta, inicialmente, na adsorção espontânea de proteínas pelo material implantado no espaço subcutâneo e, em seguida, a fixação de células. TANG et al. (1998) e HU et al. (2001) acrescentam que ocorre a fixação de fibrinogênio sobre o corpo estranho e posteriormente modificações conformacionais nesta proteína. Isso expõe dois motivos de ligação, conhecidos por P1 e P2, que servem como receptores para a molécula de adesão celular Mac-1 presente nos fagócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos. TAKAHASHI et al. (2001) confirmaram que a molécula Mac-1 é uma peça fundamental no recrutamento de neutrófilos.

Nossos resultados mostraram que as primeiras células que se fixaram nas lamínulas foram os neutrófilos e, em seguida, macrófagos (Figuras 16 e 17), assim como foi encontrado por ANDERSON (1988), MARIANO (1995), TANG et al., (1998) e FERREIRA et al., (2004). ANDERSON (1988) afirmou que a fixação dos neutrófilos na superfície de vidro gera a ativação dessas células e conseqüentemente aumenta a produção de grânulos específicos, ativando o sistema complemento e gerando agentes quimioatraentes para outros tipos celulares.

Para ANDERSON (1988) a fixação dos macrófagos na superfície do corpo estranho ocorre pela interação da célula com a molécula de C3b presente na superfície do material. MARIANO (1995) afirmou que os macrófagos inflamatórios aderidos na superfície de lamínulas implantadas no espaço subcutâneo possuem receptores C3b e Fc. Entretanto, contrariando a idéia de que as moléculas do complemento são as principais envolvidas no processo de migração celular para corpo estranho, TANG et al. (1998) afirmam que os principais quimioatraentes envolvidos na resposta inflamatória aos implantes são as quimiocinas MIP-1α e MCP-1. Essa idéia também é sustentada por FERREIRA et al. (2004) e KYRIAKIDES et al. (2004).

A partir do terceiro dia foram encontradas células gigantes multinucleadas nas lamínulas, assim como descrito por BIRMAN & MARIANO et al. (1985). Essas células eram produtos da fusão de macrófagos e, de acordo com ANDERSON (1988), estão sempre presentes na reação inflamatória de corpo estranho. DeFIFE et al. (2002) sustentam a hipótese de que as principais citocinas envolvidas no processo de formação de células multinucleadas são IL-4 e IL-13 e, para McNALLY & ANDERSON (2002), a adesão de macrófagos é dependente de uma atividade cooperativa das integrinas β1 e β2.

Mastócitos, linfócitos e fibroblastos também foram encontrados, porém não eram as células dominantes no processo. Esse fato também foi descrito por ANDERSON (1988), MARIANO (1995) e FERREIRA et al., (2004). Entretanto, TANG et al. (1998) e RODELLA et al. (2006) afirmaram que os mastócitos teciduais são as principais células envolvidas na resposta para corpo estranho.

O uso de corpo estranho implantado no espaço subcutâneo e a avaliação do perfil de migração celular não haviam sido empregados com o objetivo de verificar a atividade antiinflamatória de um tratamento tópico, entretanto, logo no primeiro dia de avaliação observou-se que o tratamento das feridas cirúrgicas afetou o perfil de migração celular e, apesar de não ter afetado os dias posteriores, isso serviu como suporte para compreender qual o direcionamento da resposta imune ao corpo estranho. Como é sugerido por ABBAS & LICHTMAN (2005), os eventos iniciais da resposta imune inata definem os eventos subseqüentes da resposta inflamatória, pois nesse momento é que

são produzidos diversos mediadores inflamatórios e citocinas que determinam os mecanismos efetores e o direcionamento do sistema imune adaptativo.

7. CONCLUSÕES

Os exames histopatológicos de pele e a avaliação dos perfis de migração celular para corpo estranho, em camundongos BALB/c que tiveram as feridas cirúrgicas submetidas a diferentes tratamentos, permitiram concluir que:

1. Os achados morfológicos das feridas cirúrgicas tratadas topicamente com óleo de *C. langsdorffii* diluído a 50% ou puro, demonstram a presença, por um período maior, de crostas serocelular e dificuldade de completar o processo de reepitelização da epiderme, ocasionando o aumento da intensidade e a persistência de alterações inflamatórias, como hiperemia, hemorragia e infiltrado inflamatório, quando comparados com animais tratados com solução salina ou óleo mineral estéril. Ou seja, o uso do óleo de *C. langsdorffii* para tratamento tópico de feridas cirúrgicas influencia de forma negativa o processo de reparo, aumentando o tempo de restabelecimento da continuidade da epiderme.

2. Os neutrófilos são as principais células envolvidas na resposta inflamatória inicial à lamínula de vidro. Os macrófagos são as células dominantes do processo a partir do terceiro dia, e podem apresentar vesículas intracitoplasmáticas e diferentes morfologias nucleares. Além disso, os macrófagos a partir do terceiro dia iniciam um processo de fusão e formação de células gigantes multinucleadas na superfície do corpo estranho. Essas células gigantes apresentam disposições circulares ou aleatórias dos núcleos.

3. A avaliação do perfil de migração celular não foi um método adequado de avaliação da atividade antiinflamatória em tratamentos tópicos, pois esse tipo de tratamento influencia a migração celular apenas nos momentos iniciais da resposta imune.

8 REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Imunidade Inata. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular.** 5 ed. São Paulo: Elsevier, 2005, cap. 12, p. 283-305.

2. ABE, M. Complement activation and inflammation. **The Japanese Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 7, p. 744-756, 2006.

3. ADAMS, G. R. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 31, n. 6, p. 782-790, 2006.

4. ADZICK, N. S.; LORENZ H. P. Cells, Matrix, Growth Factors, and the Surgeon. **Annals of Surgery**, v. 220, n. 1, p. 10-18, 1994.

5. ALBELDA, S. M.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; NEWMAN, P. J. Molecular and cellular properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 5, p. 1059-1068, 1991.

6. ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998, 1038 p.

7. ANDERSON, J. M. Inflammatory Response to Implants. **Trans Am Soc Artif Intern Organs**, v. 34, p. 101-107, 1988.

8. ANDRADE, Z. A. Tecido Conjuntivo, Reparo, Regeneração e Cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, cap. 8, p. 135-152.

9. APOSTOLOU, I.; TAKAHAMA, Y.; BELMANT, C.; KAWANO, T.; HUERRE, M.; MARCHAL, G.; CUI, J.; TANIGUCHI, M.; NAKAUCHI, H.; FOURNIÉ, J. J.; KOURILSKY, P.; GACHELIN, G. Murine natural killer cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 5141-5146, 1999.

10. BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

11. BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101-109, 1988.

12. BIANCO, C.; GOTZE, O.; COHN, Z. A. Regulation of macrophage migration by products of the complement system, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 76, n. 2, p. 888-891, 1979.

13. BIRMAN, E. G.; MARIANO, M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 18, p. 507-512, 1985.

14. BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas de ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v. 12, n. 1, p. 28-32, 1998.

15. BRITO, N. M. B.; SIMÕES, M. J.; GOMES, P. O.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F. Aspecto microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v. 13, n. 1, p. 12-17, 1999.

16. BRKOVIC, A.; SIROIS, M. G. Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 3, p. 727-737, 2007.

17. BROWN, E.J. Adhesive Interacion in the immune system. **Cell Biology**, v. 7, p. 289-295, 1997.

18. BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-204, 2001.

19. CARRICO, T. J.; MEHRHOF, A. I.; COHEN, K. Biology of Wound Healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 64, n. 4, 1984.

20. CASTRILLO, A.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A.; BOSCÁ, L. Inhibition of the nuclear Factor kB (NF-kB) pathway by Tetracyclic Kaurene Diterpenes in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 276, n. 19, p. 15854-15800, 2001.

21. COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Disponível em: http://www.cobea.org.br/animais.htm. Acesso: 05 Jun. 2005.

22. COOPER, R. N.; TAJBAKHSH, S.; MOULY, V.; BUCKINGHAM, M.; BUTLER-BROWNER, G. S. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscule. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 2895-2901, 1999.

23. DAVIS, C.; FISCHER, J.; LEY, K.; SAREMBOCK, I.J. The role of inflammation in vascular injury and repair. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 1699-1709, 2003.

24. DeFIFE, K. M.; JENNEY, C. R.; MCNALLY, A. K.; COLTON, E.; ANDERSON, J. M. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. **The Journal immunology**, v. 158, p. 3385-3390, 1997.

25. DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 7-12, 2005.

26. DEUEL, T. F.; HUANG, J. S. Platelet-derived growth factor structure, function, and roles in normal and transformed cells. **Journal Clinical Investigation**, v. 74, p. 669-676, 1984.

27. DIAS da SILVA, W.; MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 210-254, 2003.

28. DOUGLAS, C. R. Fisiopatologia da Inflamação. In: DOUGLAS, C. R. **Pato Fisiologia Geral** – Mecanismo da Doença. São Paulo: Robe, 2000, cap. 24, p. 533-582.

29. DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clinical Science**, Scotland, v. 104, p. 27-38, 2003.

30. FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap. 2, p. 32-73.

31. FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V.; FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochemistry**, Milão, v. 10, p. 905 – 907, 1971.

32. FERREIRA, M. A. N, D.; BARCELOS, L. S.; CAMPOS, P. P.; VASCONCELOS, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; ANDRADE, S. P. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). **Brithish Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 1185-1192, 2004.

33. FLECKNELL, P. A. **Laboratory Animal Anaesthesia: an introduction for research workers and technicans.** London: Academic Press limited, 1987, p. 156.

34. FORD-HUTCHINSON, A.W. Leukotriene B4 in inflammation. **Critical Reviews in immunology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 1990.

35. FREIRE, S. M. F. **Atividades analgésica, antiinflamatória e cardiovascular da *Scoparia dulcis L*. (vassourinha). Estudos químicos e farmacológicos**. 1992. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

36. FREITAS, C. V.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva de Copaifera langsdorffii Desf. (leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.

37. FUJII, E.; IRIE, K.; OHBA, K.; OGAWA, A.; YOSHIOKA, T.; YAMAKAWA, M.; MURAKI, T. Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 356, n. 4, p. 475-480, 1997.

38. GABBIANI, G. The myofibrobast in wound healing and fribrocontactive diseases. **The Journal of Pathology**, v. 200, p. 500-503, 2003.

39. GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 15, p. 51-54, 1993.

40. GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado do Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

41. HICKLEY, M. J.; KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 339-348, 1997.

42. HU, W.; EATON, J. W.; TANG, L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reations. **Blood**, v. 96, n. 4, 2001.

43. IGARASHI, A.; OKOCHI, H.; BRADHAM, M. D.; GROTENDORST, G. R. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 637-645, 1993.

44. JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbol Symposia Quantitative Biology**, v. 54, n. 1, p. 1-13, 1989.

45. KAKKAR, A. K.; LEFER, D. J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 154-158, 2004.

46. KLINGER, M.H. Platelets and inflammation. **Anatomy and Embryology**, v. 196, n. 1, p. 1-11, 1997.

47. KWON, Y.; KIM, H.; ROH, D.; YOON, S.; BAEK, R.; KIM, J.; KWEON, H. Y.; LEE, K.; PARK, Y.; LEE, J. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen systhesis in rat. **Journal Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 105-109, 2006.

48. KYRIAKIDES, T. R.; FOSTER, M. J.; KEENEY, G. E.; TSAI, A.; GIACHELLI, C. M.; CLARK-LEWIS, I.; ROLLINGS, B. J.; BORNSTEIN, P. The CC Chemokine Ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. **American Journal of Pathology**, v. 165, n. 6, 2004.

49. LAUREANO L. C. A manipulação artesanal de medicamentos. In: Plantas medicinais do cerrado: perspectivas comunitárias, para a saúde, meio ambiente e o desenvolvimento sustentável, 1999, Mineiros. **Anais do Workshop Plantas**

medicinais do cerrado. Mineiros: Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior – Projeto Centro, 1999. p. 97-110.

50. LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

51. LEY, K.; ALLIETTA, M.; BULLARD, D. C.; MORGAN, S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. **Circulation Research**, Dallas, v. 83, p. 287-294, 1998.

52. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 544p

53. LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

54. MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova,** v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

55. MACHADO, B. R.; NETO, M. B. R.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado Brasileiro**. Relatório não publicado. Conservação Internacional, Brasília, p. 26, 2004.

56. MALMSTEN, C.L. Prostaglandins, thromboxanes and leukotrinenes in inflammation. **The American Journal of Medicine**, v. 80, n. 4B, p. 7-11, 1986.

57. MARCATI, C. R.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de Copaifera langsdorffii Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae) de floresta e cerradão. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 3, 2001.

58. MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 161-176, 1995.

59. MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on Inflammation : I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study. **The Journal of Cell Biology**, v. 11, p. 571-605, 1961.

60. MANDELBAUM, S. H.; DiSANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

61. MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Reparo, Regeneração e Fibrose. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap. 3, p. 74-101.

62. McGAVIN, M. D. Músculos. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul, 1998, cap. 9, p. 417-445.

63. McINNES, E. Artefacts in histopathology. **Comp. Clin. Path.**, v. 13, p. 100-108, 2005.

64. McNALLY, A. K.; ANDERSON, J. M. β1 and β2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, 2002.

65. MEDZHITOV, R. The Innate Immune System. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, cap. 17, p. 497-517.

66. MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e UFSC, 1999, cap.9.

67. METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

68. MOTA, I. Mast cells revisited. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 8, p. 895-901, 1995.

69. MULLER, G. H.; KIRK'S, R. W. **Small Animal Dermatology**, 5. ed. 1995

70. NIU, X. F.; SMITH, C. W.; KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. **Circulation Research**, Dallas, v. 74, p. 1133-1140, 1994.

71. NRC (National Research Council). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, DC: National Academy Press, 1996, 125p

72. NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE, K.; HARAKAWA, N.; TAKANO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B4-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 2, p. 203-209, 1997.

73. OKSALA, O.; SALO, T.; TAMMI, R.; HAKKINEN, L.; JALKANEN, M.; INKI, P.; LARJAVA, H. Expression of Proteoglycans and Hyaluronan during wound healing. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 125-135, 1995.

74. PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 62, p. 73-78, 1998.

75. PAIVA, L. A.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737-739, 2002.

76. PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V.S.N. Anti-inflamatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303-307, 2003.

77. PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; De SOUZA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Jounal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 51-56, 2004a.

78. PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979-1987, 2004b.

79. PALECANDA, A.; KOBZIK, L. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 5, p. 589-595, 2001.

80. PELOSI, L.; GIACINTI, C.; NARDIS, C.; BORSELLINO, G.; RIZZUTO, E.; NICOLETTI, C.; WANNENES, F.; BATTISTINI, L.; ROSENTHAL, N.; MOLINARO, M.; MUSARO, A. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. **The FASEB Journal**, 2007.

81. PLOWDEN, C. The ethnobotany of Copaiba (Copaifera) oleoresin in the Amazon. **Economic Botany**, Ferguson Building, v. 58, n. 4, p. 729-733, 2004.

82. PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 415-445, 2000.

83. REIBMAN, J.; MEIXLER, S.; LEE, T. C.; GOLD, L. I.; CRONSTEIN, B. N.; HAINES, K. A.; KOLASINSKI, S. L.; WEISSMANN, G. Transforming Growth Factor β1, a potent chemoattractant for human neutrophis, bypasses classic signal-transduction pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 88, p. 6805-6809, 1991.

84. REZZANI, R.; RODELLA, L.; TARTAGLIA, G. M.; PAGANELLI, C.; SAPELLI, P.; BIANCHI, R. Mast cells and the inflammatory response to different implanted biomaterials. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 3, p. 211-217, 2004.

85. RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. O.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; REGIANI, A. M. **Variedade química e física do óleo-resina de *Copaifera spp*. no sudoeste da Amazônia brasileira**. Disponível

em: http://www.sccnet.com.br/jackson/rbof/artigo/25_rbof,8(2-3),851-861,2004.pdf. Acesso: 02 fev. 2007.

86. RINGLER, D. J. Inflamação e reparo. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Malone, 1997, cap. 5, p. 119-165.

87. RODELLA, L.F.; REZZANI, R.; BUFFOLI, B.; BOBOMINI, F.; TENGATTINI, S.; LAFFRANCHI, L.; PAGANELLI, C.; SAPELLI, P.L.; BIANCHI, R. Role of mast cells in wound healing process after glass-fiber composite implant in rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 10, n. 4, p. 946-954, 2006.

88. ROSENBERG H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, cap. 37, p. 1151-1169.

89. ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D.F. The biology of platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 155-169, 1986.

90. SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**, 6ª. ed., Melhoramentos: São Paulo, p. 65, 1975.

91. SANDULACHE, V. C.; PAREKH, A.; LI-KOROTKY, H.; DOHAR, J. E.; HEBDA, P. A. Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-β1–induced collagen synthesis. **Wound repair and regeneration**, v. 15, n. 1, p. 122-133, 2007.

92. SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 334-341, 2000.

93. SIROIS, P.; BORGEAT, P. Pharmacology of the leukotrienes. **Journal of Pharmacologie**, v. 15, n. 1, p. 53-68, 1984.

94. SOLOWIEJ, A.; BISWAS, P.; GRAESSER, D.; MADRI, J. A. Lack of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 3, p. 953-962, 2003.

95. STEEBER, D. A.; CAMPBELL, M. A.; BASIT, A.; LEY, K.; TEDDER, T. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intracellular adhesion molecule-1 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7562-7567, 1998.

96. STEENFOS, H. H. Growth Factors and Wound Healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 28, p. 95-105, 1994.

97. STEIN, D. **A cura natural para cães e gatos**. São Paulo: Editora Ground, 1998. 330p.

98. TAKAHASHI, M; KITAGAWA, S.; MASUYAMA, J. I.; IKEDA, U.; KASAHARA, T.; TAKAHASHI, Y.; FURUKAWA, Y.; KANO, S.; SHIMADA, K. Human Monocyte–Endothelial Cell Interaction Induces Synthesis of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Circulation**, v. 93, p. 1185-1193, 1996.

99. TAKAHASHI, T.; HATO, F.; YAMANE, T.; FUKUMASU, H.; SUZUKI, K.; OGITA, S.; NISHIZAWA, Y.; KITAGAWA, S. Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. **Circulation Research**, Dallas, v. 88, p. 422-429, 2001.

100. TANG, L.; JENNINGS, T. A.; EATON, J. W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 95, n. 15, p. 8841-8846, 1998.

101. TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária** – Uma Introdução. 5 ed. Rio de Janeiro: Roca, 1998, 545p.

102. TRAVIS, J. Biotech gets a grip on cell adhesion (cell adhesion molecules show promise in medical treatments). **Science,** v. 260, p. 5110, 1993.

103. VAN VLEET, J. F. Músculo esquelético. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Malone, 2000, cap. 18, p. 887-911.

104. VAUGHAN, M. B.; HOWARD, E. W.; TOMASEK, J. J. Transforming Growth Factor-β1 promotes the morphological and functional diffentiation of the myofibroblast. **Experimental Cell Research**, v. 257, p. 180-189, 2000.

105. VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

106. WALSH, L. J.; TRINCHIERI, G.; WALDORF, H. A.; WHITAKER, D.; MURPHY, G. F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 88, p. 4220-4224, 1991.

107. WARREN, G. L.; O'FARRELL, L.; SUMMAN, M.; HULDERMAN, T.; MISHRA, D.; LUSTER, M. I.; KUZIEL, W. A.; SIMEONOVA, P. P. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. **American Journal of Physiology-cells Physiology**, v. 286, n. 5, 2004.

108. WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

109. WU, Y.; STABACH, P.; MICHAUD, M.; MADRI, J. A. Neutrophils lacking Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 3484-3491, 2005.

ANEXOS

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Um dia após o implante do corpo estranho 1/2.

MICRO																	
GRUPO	presença de crosta	necrose			infiltrado inflamatório						hemorragia			hiperemia		proliferação vascular	
					MN			PMN									
	serocelular	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	der	mus	der	mus
P1CA1	2	1	2	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
P1CA2	3	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1	2	1	2	1	0	0
P1CA3	3	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1	2	1	2	1	0	0
mediana	**3,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**
P1CVA1	2	2	2	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
P1CVA2	1	1	2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0
P1CVA3	2	0	1	1	0	0	0	0	2	1	2	2	2	1	0	0	0
mediana	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
P1T1A1	3	1	2	2	0	0	0	0	1	0	1	3	1	2	0	0	0
P1T1A2	3	2	2	1	0	0	0	0	2	2	0	1	1	1	0	0	0
P1T1A3	2	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
mediana	**3,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
P1T2A1	3	3	2	1	0	0	0	0	2	1	0	2	0	2	0	0	0
P1T2A2	3	3	2	1	0	0	0	0	2	1	1	3	1	3	1	0	0
P1T2A3	2	2	2	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	0	0	0
mediana	**3,0**	**3,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

NA: não avaliado

C controle
CV controle veículo
T1 tratamento 1
T2 tratamento 2

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Um dia após o implante do corpo estranho 2/2.

	MICRO						MACRO				
GRUPO	reepitelização da epiderme	hiperplasia da epiderme	proliferação fibroblastica na derme	proliferação fibroblastica na muscular	sinais de regeneração na muscular	OBS	Estado geral da ferida	Aspecto da ferida	Edema	Hiperemia	OBS
P1CA1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1CA2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1CA3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
mediana	-	-	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	-
P1CVA1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1CVA2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1CVA3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
mediana	-	-	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	-
P1T1A1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1T1A2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1T1A3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
mediana	-	-	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	-
P1T2A1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1T2A2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
P1T2A3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	1	-
mediana	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	-

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Três dias após o implante do corpo estranho 1/2.

MICRO																	
GRUPO	presença de crosta serocelular	necrose			infiltrado inflamatório						hemorragia			hiperemia		proliferação vascular	
					MN			PMN									
		epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	der	mus	der	mus
P3CA1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	2	1	1	1
P3CA2	3	1	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	1	1	0
P3CA3	2	0	0	1	0	1	0	0	2	1	2	2	0	3	0	2	1
mediana	**3,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**
P3CVA1	2	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1	3	2	3	2	1	1
P3CVA2	2	1	1	0	0	1	1	0	3	3	1	2	0	2	1	1	0
P3CVA3	2	0	0	0	0	1	0	0	2	1	1	2	1	2	1	1	0
mediana	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**
P3T1A1	2	2	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	1	2	1	1	0
P3T1A2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	1	2	0	3	2	2	1
P3T1A3	3	2	1	1	0	1	1	0	3	3	1	2	1	2	1	1	0
mediana	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**
P3T2A1	3	3	2	1	0	0	0	0	2	2	2	0	0	2	2	1	1
P3T2A2	3	3	2	1	0	1	1	0	2	2	1	2	1	2	2	1	1
P3T2A3	2	3	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2	1	1	1	1	1
mediana	**3,0**	**3,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

NA: não avaliado

C controle
CV controle veículo
T1 tratamento 1
T2 tratamento 2

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Três dias após o implante do corpo estranho 2/2.

	MICRO						MACRO				
GRUPO	reepitelização da epiderme	hiperplasia da epiderme	proliferação fibroblastica na derme	proliferação fibroblastica na muscular	sinais de regeneração na muscular	OBS	Estado geral da ferida	Aspecto da ferida	Edema	Hiperemia	OBS
P3CA1	presente	presente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	1	crostas
P3CA2	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
P3CA3	presente	presente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	1	1	crostas
mediana	**-**	**-**	-	-	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	
P3CVA1	presente	ausente	presente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	1	2	crostas
P3CVA2	ausente	ausente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
P3CVA3	presente	presente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	1	1	crostas
mediana	**-**	**-**	-	-	**-**	**-**	**-**	**-**	**1,0**	**2,0**	
P3T1A1	ausente	ausente	presente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
P3T1A2	ausente	presente	ausente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	1	crostas
P3T1A3	presente	presente	ausente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
mediana	**-**	**-**	**-**	-	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	
P3T2A1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
P3T2A2	presente	presente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	1	crostas
P3T2A3	ausente	ausente	presente	ausente	presente	-	Bom	fechada	2	2	crostas
mediana	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: cinco dias após o implante do corpo estranho 1/2.

MICRO																	
GRUPO	presença de crosta	necrose			infiltrado inflamatório						hemorragia			hiperemia		proliferação vascular	
					MN			PMN									
	serocelular	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	der	mus	der	mus
P5CA1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	1	0
P5CA2	3	1	0	0	0	2	1	0	3	2	1	1	2	2	1	1	1
P5CA3	-	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**
P5CVA1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
P5CVA2	-	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	1	1	2	1
P5CVA3	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0	1	1	0	1
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**
P5T1A1	1	0	0	0	0	2	2	0	1	1	0	1	0	2	1	1	0
P5T1A2	2	0	0	0	0	3	3	0	2	2	1	1	0	2	2	1	1
P5T1A3	2	1	1	1	0	3	2	0	3	2	0	1	0	2	2	1	1
mediana	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**3,0**	**2,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**
P5T2A1	2	1	0	NA	0	2	NA	0	2	NA	0	2	NA	1	NA	1	NA
P5T2A2	3	0	0	0	0	1	2	0	3	2	1	2	1	2	2	1	1
P5T2A3	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1	2	2	1	1
mediana	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**1,0**

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

NA: não avaliado

C controle
CV controle veículo
T1 tratamento 1
T2 tratamento 2

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Cinco dias após o implante do corpo estranho 2/2.

	MICRO						ACHADOS MACROCÓPICOS				
GRUPO	reepitelização da epiderme	hiperplasia da epiderme	proliferação fibroblastica na derme	proliferação fibroblastica na muscular	sinais de regeneração na muscular	OBS	Estado geral da ferida	Aspecto da ferida	Edema	Hiperemia	OBS
P5CA1	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
P5CA2	ausente	ausente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	2	crostas
P5CA3	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
mediana	**-**	**-**	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**1,0**	**1,0**	-
P5CVA1	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
P5CVA2	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
P5CVA3	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
mediana	**-**	**-**	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**1,0**	**1,0**	-
P5T1A1	presente	presente	presente	presente	presente	reepitelização incompleta	Bom	fechada	2	2	peq. crostas
P5T1A2	presente	presente	presente	presente	presente	reepitelização incompleta	Regular	fechada	2	2	crostas
P5T1A3	presente	NA	presente	presente	ausente	reepitelização incompleta	Regular	fechada	2	2	crostas
mediana	**-**	**-**	-	-	-	-	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	-
P5T2A1	presente	presente	presente	presente	NA	reepitelização incompleta	Regular	fechada	2	2	crostas
P5T2A2	presente	presente	presente	presente	presente	reepitelização incompleta	Regular	fechada	2	2	crostas
P5T2A3	presente	presente	presente	presente	presente	reepitelização incompleta	Regular	fechada	2	2	crostas
mediana	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	-

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Sete dias após o implante do corpo estranho 1/2.

MICRO																	
GRUPO	presença de crosta	necrose			infiltrado inflamatório						hemorragia			hiperemia		proliferação vascular	
					MN			PMN									
	serocelular	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	der	mus	der	mus
P7CA1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
P7CA2	-	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
P7CA3	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**
P7CVA1	-	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
P7CVA2	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
P7CVA3	-	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**
P7T1A1	-	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
P7T1A2	2	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	2	0	1	1	1	1
P7T1A3	2	0	0	0	0	3	2	0	1	0	1	1	2	2	2	1	1
mediana	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**3,0**	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**
P7T2A1	3	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	1
P7T2A2	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2
P7T2A3	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1
mediana	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**2,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**	**1,0**

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

NA: não avaliado

C controle
CV controle veículo
T1 tratamento 1
T2 tratamento 2

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Sete dias após o implante do corpo estranho 2/2.

	MICRO						MACRO				
GRUPO	reepitelização da epiderme	hiperplasia da epiderme	proliferação fibroblastica na derme	proliferação fibroblastica na muscular	sinais de regeneração na muscular	OBS	Estado geral da ferida	Aspecto da ferida	Edema	Hiperemia	OBS
P7CA1	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	1	1	sem crostas
P7CA2	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	1	1	sem crostas
P7CA3	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	1	1	sem crostas
mediana	-	-	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**1,0**	**1,0**	-
P7CVA1	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	1	1	sem crostas
P7CVA2	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	1	1	sem crostas
P7CVA3	presente	presente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	2	2	pequenas crostas
mediana	-	-	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**1,0**	**1,0**	-
P7T1A1	presente	presente	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	2	2	crostas
P7T1A2	presente	presente	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	3	2	crostas
P7T1A3	presente	NA	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	2	3	crostas
mediana	-	**-**	-	-	-	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	-
P7T2A1	presente	presente	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	2	2	crostas
P7T2A2	presente	presente	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	2	1	sem crostas
P7T2A3	presente	ausente	presente	presente	presente	-	Regular	fechada	2	3	crostas
mediana	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**2,0**	-

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Quatorze dias após o implante do corpo estranho 1/2.

MICRO																	
GRUPO	presença de crosta serocelular	necrose			infiltrado inflamatório						hemorragia			hiperemia		proliferação vascular	
					MN			PMN									
		epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	epi	der	mus	der	mus	der	mus
P14CA1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
P14CA2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P14CA3	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
P14CVA1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0
P14CVA2	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P14CVA3	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
P14T1A1	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
P14T1A2	-	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
P14T1A3	-	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**
P14T2A1	-	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
P14T2A2	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
P14T2A3	-	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
mediana	**-**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**2,0**	**1,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**	**1,0**	**0,0**

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

NA: não avaliado

C controle
CV controle veículo
T1 tratamento 1
T2 tratamento 2

PLANILHA DE AVALIAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS

Ponto experimental: Quatorze dias após o implante do corpo estranho 2/2.

	MICRO						MACRO				
GRUPO	reepitelização da epiderme	hiperplasia da epiderme	proliferação fibroblastica na derme	proliferação fibroblastica na muscular	sinais de regeneração na muscular	OBS	Estado geral da ferida	Aspecto da ferida	Edema	Hiperemia	OBS
P14CA1	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	1	sem crosta
P14CA2	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	1	sem crosta
P14CA3	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	1	sem crosta
mediana	**-**	**-**	**-**	-	-	**-**	**-**	**-**	**0,0**	**1,0**	-
P14CVA1	presente	presente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	2	sem crosta
P14CVA2	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	1	sem crosta
P14CVA3	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	0	1	sem crosta
mediana	**-**	**-**	**-**	-	-	**-**	**-**	**-**	**0,0**	**1,0**	-
P14T1A1	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	2	2	sem crosta
P14T1A2	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	2	1	sem crosta
P14T1A3	presente	ausente	presente	presente	presente	-	ótimo	fechada	2	1	sem crosta
mediana	**-**	**-**	**-**	-	-	**-**	**-**	**-**	**2,0**	**1,0**	-
P14T2A1	presente	ausente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	3	2	pele espessa
P14T2A2	presente	ausente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	3	2	pele espessa
P14T2A3	presente	ausente	presente	presente	presente	-	Bom	fechada	3	2	pele espessa
mediana	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**3,0**	**2,0**	-

Legenda: 0: ausente
1: discreto
2: moderado
3: acentuado

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo